

Innovative Aufreinigungsstrategien auf Membranadsorberbasis für rekombinante Zytokine

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation von

Gesa-Maria Gieseler, M. Sc.

geb. Brockmeier

Geboren am 17. Oktober 1988 in Wilhelmshaven

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Koreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas
Tag der Promotion: 14.09.2018

I Kurzfassung

Das Downstream Processing ist bis heute kostenintensiv und birgt bis zu 80% der Herstellungskosten für biotechnologische Produkte. Ein großes Bestreben liegt daher in der Optimierung, um ökonomische Aufarbeitungsprozesse zu realisieren. Um Limitierungen der klassischen bead-basierten Säulenchromatographie zu umgehen, bieten Membranadsorber Möglichkeiten die Aufreinigung von Proteinen industriell attraktiv zu gestalten. Der Stofftransport erfolgt hauptsächlich durch Konvektion und reduziert sowohl Prozesszeit als auch Elutionsvolumen. Die Diffusionslimitierung ist bei Membranadsorbern geringer verglichen mit konventionellen beads. Dies beschleunigt die Prozessgeschwindigkeit während der Aufreinigung. Durch den Einsatz innovativer Membranadsorbereinheiten kann die Anzahl der benötigten Schritte reduziert und die Produktivität des Gesamtprozesses gesteigert werden. Die Übertragung vom Laborversuch in den industriellen Maßstab ist durch den modularen Aufbau vereinfacht. Insbesondere die Erweiterung des Anwendungsspektrums durch den Einsatz innovativer Plattform-Aufarbeitungstechnik steht im Fokus.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Membranadsorber-Technologie zur Aufreinigung von Zytokinen sollte untersucht werden. Zytokine spielen eine entscheidende Rolle für die Stammzellkultivierung und Generierung von künstlichem Gewebe. Nach heutigem Stand der Technik erfordert die Gewinnung rekombinant hergestellter, humaner Zytokine mehrstufige Aufreinigungsprozesse mittels chromatographischer Verfahren.

Die Anwendung der Membranadsorber wurde anhand von drei Modellproteinen aus der Klasse der Zytokine getestet. Bei den Modellproteinen handelt es sich um anspruchsvolle biologisch aktive Proteine, deren Darstellung prozesstechnisch aufwendig ist. Die hohe Tendenz zur Proteinaggregation oder aufwendige Renaturierungsschritte sind nur einige Beispiele, um die Komplexität der Aufreinigung zu beschreiben. Ziel der modernen Aufarbeitung ist es, Virusverunreinigungen durch tierische Komponenten zu vermeiden. Um einen Prozess als „animal component free“ bezeichnen zu können, müssen auf Heparin-basierende Aufarbeitungsmedien umgangen werden, was oft in niedrigen Produkttitern resultiert und den Prozess unwirtschaftlich macht.

Schlagerwörter: *Membranchromatographie, axiale Membranadsorber, tangentielle Membranadsorber, FGF-2 rekombinante Proteinproduktion, rhBMP-2, rhBMP-4, rekombinante Zytokine, Inclusion Bodies, mixed mode Membranchromatographie*

II Abstract

Downstream processing accounts for substantial cost in the production of cytokines. To overcome the limitations of commonly used packed bed chromatography columns, innovative cation exchange membrane adsorbers as a basis for rapid bioseparation are presented. Here, the transport of solutes to the binding sites takes place predominantly by convection, thereby reducing both process time and eluate volume. Moreover, scale up of membrane chromatography is simple due to its modular format.

While membrane chromatography in direct capture mode integrates clarification and protein capture into one single unit operation and thus reduces the number of stages in the downstream process. Additionally, we introduce new weak and strong cation exchange membrane adsorbers combining mixed mode ligand chemistry and an optimized membrane platform for the purification of cytokines. The results show that the ligand chemistry as well as the membrane matrix can have impact on the selectivity, binding and the recovery of the cytokine. The membrane-based bioseparation technology made large scale purification of high-value proteins possible. Implementation of a functional upscaling process was required for economic feasibility.

We introduce three model proteins to apply alternative purification strategies using membrane chromatography. Due to their unique structural motive, purification is rather challenging. High protein aggregation and renaturation steps accounts for complexity of the isolation process.

Another aspect is the implementation of an animal component free process. Here, membrane adsorber strategies substitute conventional approaches using heparin chromatography. This plays an important role for the certification of the product regarding purity.

Key words: *membrane chromatography, axial flow device, tangential flow device, FGF-2 protein production, BMP-2 protein production, BMP-4 protein production, recombinant cytokines, inclusion bodies, mixed mode membrane adsorber*

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2015 bis März 2017 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften veröffentlicht oder auf internationalen Fachkonferenzen in Form von Vorträgen oder Poster-Präsentationen vorgestellt. If you cite parts of this doctoral thesis, please use the original sources.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen

- I G. Gieseler (95%), I. Pepelanova, A. Müller (5%), T. Scheper, S. Beutel, L. Villain: Considerations on the flow configuration of membrane chromatography devices for the purification of high-value bioactives, *Engineering in Life Science*, 16(8) (2016)
- II G. Gieseler (95%), I. Pepelanova, L. Stuckenberg (5%), T. Scheper, U. Odenthal, U. Rinas, V. Noelle, L. Villain: Purification of BMP-2 from refolding mixtures using mixed mode membrane chromatography, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1): 123-130 (2016)
- III G. Gieseler (90%), K. Ekramzadeh (5%), V. Nölle, S. Malysheva (5%), H. Kempf, S. Beutel, R. Zweigerdt, U. Martin, U. Rinas, T. Scheper, I. Pepelanova: Solubilization and renaturation of biologically active human bone morphogenetic protein-4 from inclusion bodies, *Biotechnology Reports*, 18 (2018)

Kongressbeiträge

- I G. Gieseler, I. Pepelanova, A. Müller, T. Scheper, S. Beutel, L. Villain: Innovative purification strategies for cytokines: Mixed-mode chromatography using membrane adsorbers, *Chromatography PhD Seminar, Sundern*, (2014)
- II G. Gieseler, I. Pepelanova, T. Scheper, U. Rinas, V. Noelle, L. Villain: Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography, *Biocat, Hamburg* (2014)
- II G. Gieseler, I. Pepelanova, T. Scheper, U. Rinas, V. Noelle, L. Villain: Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography, *Conference of scientific cooperation between Israel and Lower Saxony, Hanover* (2015)
- III G. Gieseler, I. Pepelanova, T. Scheper, U. Rinas, V. Noelle, L. Villain: Alternative purification strategy for Bone morphogenetic protein-4, *Rebirth Symposium*, Hanover (2015)
- IV G. Gieseler, I. Pepelanova, T. Scheper, U. Rinas, V. Noelle, L. Villain: Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography, *ProcessNet und Dechema Jahrestagung, Aachen* (2016)

Inhalt

I Kurzfassung	3
II Abstract.....	4
Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	6
1. Einleitung und Zielsetzung.....	9
2. Theorie	13
2.1 Zytokine.....	13
2.2 Fibroblast-Growth Factor-Familie.....	15
2.3 Fibroblast-Growth Factor 2	15
2.4 Bone morphogenetic proteins	16
2.5 Eigenschaften der TGF- β Familie	17
2.6 Das Cystein-Knoten Motiv	19
2.7 Bone morphogenetic protein 2	19
2.8 Bone morphogenetic protein 4	20
2.9 Membranadsorber-Technologie.....	21
2.10 Partikelgängige Membranadsorber.....	23
2.11 Mixed mode Membranadsorber.....	25
3. Zusammenfassung FGF-2	27
3.1 Abstract	30
3.2 Material and methods	33
3.3 Results and discussion.....	37
3.4 Conclusion.....	46
4. Zusammenfassung BMP-2	47
4.1 Abstract	51
4.2 Introduction	52

4.3 Materials and Methods	54
4.5 Conclusion.....	68
5. Zusammenfassung BMP-4	70
5.1 Abstract:	72
5.2 Introduction	73
5.3 Materials and Methods	75
5.3 Results and discussion.....	78
5.5 Conclusion.....	86
6 Diskussion und Ausblick.....	87
Literaturverzeichnis.....	90
Verzeichnisse	97
Abkürzungsverzeichnis	1011
Lebenslauf	1022

1. Einleitung und Zielsetzung

Knochenbrüche lassen sich heute gut behandeln. Nach wie vor kommt es aber immer wieder zu Komplikationen: Der Heilungsprozess schreitet nur langsam voran oder es treten Infektionen auf, die so schwer verlaufen können, dass eine Amputation der betroffenen Gliedmaßen die einzig lebensrettende Maßnahme ist. Könnten Knochenbrüche besser geheilt werden? Die Antwort liegt im Menschen selbst. In seinem Körper gibt es überall Substanzen, die solche Heilungsprozesse fördern, Brüche schneller heilen und Infektionen seltener auftreten lassen; sie werden Zytokine genannt. Zytokine sind niedermolekulare Proteine, die als Botenstoffe das Verhalten von Zellen beeinflussen. Sie sind allerdings nur in geringer Konzentration am Wirkort vorhanden; die Bereitstellung ausreichender Mengen ist jedoch notwendig, um Wunden und Knochenbrüche zu heilen.

Immer mehr dieser therapeutischen Proteine können auch fermentativ produziert werden. Der damit verbundene Zuwachs an Produktivität birgt aber auch Probleme. Denn das Downstream Processing, also die Reinigung, ist aufwändig und verschlingt bis zu 80% der Herstellungskosten. Um die wachsende Nachfrage zu decken, steigt daher auch der Bedarf an klassischen Aufarbeitungsmethoden wie z.B. Chromatographie-Materialien. Hinzu kommt, dass eine erhöhte Zykluszahl oder der Einsatz von Säulen mit größerem Durchmesser auch das Filtrations- und Elutionsvolumen erhöht, was die Kosten weiter signifikant steigen lässt.

Gerade biotechnologische Verfahren bieten großes Potential Zytokine einfacher und kostengünstiger zu produzieren. Eine Herausforderung bleibt jedoch die gezielte Aufreinigung der Zytokine, die für die therapeutische Nutzung essentiell ist.

Während der Upstream Prozess sowie die primäre Isolierung und das Abtrennen des Zellmaterials weniger ein Problem darstellt, ist der Einsatz von Chromatographie-Säulen zwar technisch machbar, stößt aber an physikalische und ökonomische Grenzen. Es gibt daher Bestrebungen, insbesondere die sehr teure Affinitätschromatographie zu ersetzen und die Zahl der Chromatographieschritte zu beschränken. Membranadsorber könnten in diesem Kontext eine machtvollere Alternative zu klassischen partikel-basierten Systemen bieten.

Die Effizienz des Downstream Processing ist wichtig für die ökonomische industrielle Herstellung. Um eine hohe Reinheit der Zytokine zu garantieren, sind viele Prozessschritte

notwendig. Die Applikation der Zytokine, z. B. in der medizinischen Forschung, macht die Einhaltung strenger GMP-Standards und single-use Anwendungen notwendig.

Neuartige Aufreinigungsstrategien auf Membranadsorberbasis stellen eine vielversprechende Alternative zum konventionellen Downstream Processing dar und erweitern das Portfolio wertschöpfender Zytokine, die den Anwendern zur Verfügung stehen. Der modulare Aufbau und die Möglichkeit zur Kombination verschiedener Austauschphasen erweitert das Anwendungsspektrum.

In dieser Dissertation wurden direct capture-Module, die ein tangenciales Strömungsverhalten aufweisen, mit konventionellen, axial durchströmten Modulen verglichen. Der Vorteil der tangential angeströmten Module liegt in der Integration eines Filtrations- und eines capture-Schrittes. Membranadsorber-Kapsule mit axialer Durchströmung wurden auf Bindungskapazität und Performance getestet. Der Fibroblast Growth Factor (FGF-2) dient als Modellprotein, um Membranadsorber mit unterschiedlichen Strömungsverhalten zu untersuchen.

In der klassischen Ionenaustauschchromatographie schwächt eine zu hohe Konzentration an Additiven und Gegenionen die Bindung des Targetmoleküls an die Membran. Das Anwendungsspektrum ist somit limitiert. Sogenannte mixed mode-basierte Membranadsorber können das Anwendungsfenster für IEX erweitern. Als Beispielprotein wurde rekombinant produziertes humanes Bone morphogenetic protein (rhBMP-2) gewählt. Aufgrund eines komplexen Strukturmotives, dem Cystinknoten, wird dieses Protein ausschließlich in Inclusion Bodies produziert. Eine Rückfaltung in seine native Form erfordert die Zugabe hoher Konzentrationen an Faltungsadditiven. Diese Komponenten erschweren das Downstream Processing. Um die native Form des Proteins zu erhalten, muss außerdem eine Dimerisierung erfolgen. Die Trennung von Monomer und Dimer, die ähnliche chemische Eigenschaften aufweisen, birgt eine zusätzliche Herausforderung.

Die klassische Aufreinigung beinhaltet eine Affinitätschromatographie auf Basis von Heparin. Dieses Heparin ist i.d.R. tierischen Ursprungs und daher problematisch, da es so zu einem Produkt führt, das nicht als frei von tierischen Bestandteilen deklariert werden kann. Eine Substitution des tierischen Heparins ist daher unbedingt anzustreben. Membranadsorber, die unter hohen Salzkonzentrationen arbeiten, könnten dies leisten. Sie reduzieren zum einen Verdünnungsschritte, zum anderen umgehen sie die teure Affinitätschromatographie.

Das in BMP-2 vorhandene Cystinknotenmotiv ist auch in der Sequenz des strukturell ähnlichen BMP-4 präsent. Dieses Motiv erschwert die Produktion und Aufreinigung des Proteins. In der Literatur gibt es nur wenige Beispiele für eine erfolgreiche Produktion und das Downstream Processing für BMP-4. Die Entwicklung einer ökonomischen Aufarbeitungsstrategie für BMP-4 basierend auf Membranadsorbertechnologie ist daher auch Gegenstand dieser Arbeit.

Zielsetzung:

Das Ziel dieser Dissertation ist die Erarbeitung vereinfachter, ökonomischer und standardisierter Aufarbeitungsprozesse mit Membranadsorbertechnologie zur Aufreinigung der Zytokine FGF-2, BMP-2 und BMP-4 im Labor und Produktionsmaßstab.

Die Membranadsorbertechnologie ermöglicht die effiziente Gewinnung dieser Proteine in biologisch aktiver Form aus Produktlösungen, wie z. B. Zelllysat oder Renaturierungslösungen.

MA mit unterschiedlicher Strömungskonfiguration wurden für das Downstream Processing des rekombinant produzierten Zytokins FGF-2 verwendet. Es sollte untersucht werden, ob ein tangential durchströmter MA Filtrations- oder Sedimentationsschritte einzusparen kann. Das bedeutet der Zentrifugationsschritt wird übersprungen und der MA direkt mit Zelllysat beladen, um einen Prozessschritt einzusparen. Die Einsparung einer Operation Unit dient dazu, Kosten der Aufreinigung zu senken und biotechnologische Verfahren ökonomischer zu gestalten.

Modular aufgebaute Membranadsorber mit kombinierten Austauschergruppen wurden für die Aufreinigung von rhBMP-2 genutzt. Die Kombination verschiedener Austauschergruppen steigert das Anwendungsspektrum, insbesondere unter Hochsalzbedingungen. Da rhBMP-2 aufgrund des Cystinknotenmotivs Renaturierungsschritte benötigt, ist das Eluat mit Salzen angereichert, was eine direkte Isolation verhindert. Membranadsorber, die unter Hochsalzbedingungen arbeiten, könnten dies leisten. Sie reduzieren zum einen Verdünnungsschritte zum anderen umgehen sie die teure Affinitätschromatographie. Außerdem werden tierische Komponenten wie Heparin substituiert.

Die Produktion und Aufreinigung des rhBMP-4 Proteins ist, trotz der sequentiellen Ähnlichkeit zu rhBMP-2, schwierig. Ein robustes Upstream and Downstream Processing sollte für rhBMP-4 entwickelt werden. Ein Schwerpunkt lag darin, die optimalen Rückfaltungsbedingungen für rhBMP-4 zu analysieren. Das Downstream Processing sollte mittels Membranadsorbern realisiert werden.

2. Theorie

2.1 Zytokine

Das Forschungsgebiet der Zytokine verbindet naturwissenschaftliche und medizinische Fachrichtungen. Kaum ein anderes Gebiet ist so interdisziplinär aufgebaut. Das Verständnis der außerordentlich komplexen Wirkungsweisen und Interaktionen ist jedoch immer noch lückenhaft. Die Beschreibung der Zytokine ist komplex. Eine erste Definition bildet einen Leitfaden für diese hormonell ähnliche Proteinklasse:

Zytokine bezeichnen niedermolekulare, regulatorische Proteine, die von Leukozyten und einer Reihe weiterer Zellen sezerniert werden. Durch ihre pleiotrope Wirkung regulieren sie Mediatoren, meist über kurze Distanzen, üben zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems aus und kontrollieren entzündliche Prozesse. [46]

Tabelle 2-1: Charakteristische Eigenschaften der Zytokine und Abgrenzung zu Hormone [33].

	Zytokine	Hormone
Produzent	Zahlreiche verschiedene Zelltypen	Ein spezialisierter Zelltyp
Eigenschaft	redundant	Pleiotrop
Zielzelle	zahlreiche	Einige wenige
Wirkweise	Autokrin, aparkrin, juxtakrin, selten endokrin	Endokrin

Biologisch gesehen werden die hormon ähnlichen Wirkstoffe erst nach Stimulierung produziert und lösen an ihrem Zielort mannigfaltige Reaktionen aus. Viele Zytokine zeigen redundante Effekte. Trotz struktureller Unterschiede lösen sie ähnliche Prozesse im Organismus aus. In erster Linie starten sie in ihren Zielzellen die Zellteilung und dienen als Wachstumsfaktoren. Es werden jedoch auch Effektor-und Regulationsfunktionen von ihnen mobilisiert. Anhand bestimmter struktureller Gemeinsamkeiten lassen sich Zytokine in verschiedenen Klassen gruppieren. Eine andere Art der Klassifizierung basiert auf eher funktionalen Aspekten; hier werden sie nach Wirkung in fünf Klassen unterschieden:

Interferone (IFN) werden vor allem von Leukozyten (Monozyten, Makrophagen) produziert. Sie steuern die intrazelluläre Antwort des Immunsystems und bekämpfen homologe und heterologe Viren und Tumorzellen.

Interleukine (IL) gehören neben den IFN zu den ersten beschriebenen Zytokinen und sind Proteine, die Leukozyten zum Austausch von Informationen untereinander verwenden. Sie nehmen in erster Linie Funktionen im Immunsystem ein, zeichnen sich aber durch eine Reihe weiterer Funktionen aus. [22]

Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) spielen eine Rolle bei der Entzündung und der sog. Akute-Phase-Reaktion. Ihre Aktivität ist weit gespannt, sie reicht von der Immunregulation, wobei apoptotischer Zelltod induziert wird, über die Kontrolle der Lymphknotenentwicklung bis hin zur Antitumorwirkung. [9, 33]

Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) bezeichnen Glykoproteine, die ursprünglich in der Hämatopoese die Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen kontrolliert haben. Die dadurch aktivierten Signalwege führen zur Ausdifferenzierung von speziellen Blutzellen (meist Leukozyten). Allerdings besitzen sie zusätzliche Funktionen:

Sie stimulieren bestimmte CSFs die antimikrobielle Aktivität von Neutrophilen und die Zytokinproduktion von Monozyten. [33]

Eine neuere Gruppe an Zytokinen bezeichnen die Chemokine, die nach ihrer Fähigkeit benannt sind die Chemotaxis auszulösen. Ihre Größe variiert zwischen 8 bis 10 kDa abhängig von vier relevanten Cytelinresten an konservierten Positionen und der Anzahl der Aminosäuren, die sich dazwischen befinden, wodurch sie ihre spezielle dreidimensionale Struktur ausbilden können. [33]

Neben den bereits bekannten Zytokinen werden auch die Wachstumsfaktoren zu diesen gezählt. Dies sind Mediatoren, die das Wachstum von nicht hämatopoetischen Zellen stimulieren z. B. Transforming Growth Factor (TGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). [33]

2.2 Fibroblast-Growth Factor-Familie

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren bezeichnen eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die als FGF-Familie bekannt ist. Mittlerweile sind 23 Mitglieder der FGF-Gruppe bekannt und nach folgender Nomenklatur benannt: FGF-1 bis FGF-23. FGF-Proteine wirken mitogen auf viele mesodermale und neuroektodermale Zellen, fördern aber auch die Differenzierung eben dieser. Sie besitzen positiven Einfluss auf die neuronale Differenzierung von sympathoadrenalen Vorläuferzellen und bewirken ihre Abhängigkeit vom Nervenwachstumsfaktor. Die bekanntesten Vertreter sind das saure und das basische FGF-Protein, sie werden als FGF-1 und FGF-2 bezeichnet und werden beide in neuronalem Gewebe gefunden. Mit Ausnahme von FGF-1 und FGF-2 besitzen alle FGFs eine Signalsequenz und sind glykosyliert.

2.3 Fibroblast-Growth Factor 2

Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) besitzt ein Molekulargewicht von 18.000 Da und umfasst 155 Aminosäuren. FGF-2 besitzt vier Cysteinreste. Diese bilden aber keine intramolekularen Disulfidbrücken aus. Außerdem beinhalten sie eine hohe Anzahl basischer Reste (pI= 9,6) und zwei Bindestellen (Ser 64 and Thr 112), die durch Proteinkinase A and C phosphoryliert werden können. Auf Proteinebene beträgt seine Sequenzhomologie mit FGF-1 55%. Neben dieser Form des FGF-2 gibt es noch zwei Varianten mit einer Länge von 131 bzw. 146 Aminosäuren. Das für FGF-2 codierende Gen umfasst ca. 38 kb, besitzt drei Exons und ist beim Menschen auf Chromosom 4 lokalisiert. FGF-2 liegt stark konserviert vor. Der isoelektrischen Punkt von FGF-2 liegt bei pH 9,6. Bei pH < 4 kommt es zum Aktivitätsverlust des Proteins. FGF-2 ist Mitglied einer großen Proteinfamilie, die an Heparin und Heparansulfate binden und Einfluss nehmen auf Wachstum, Differenzierung und Migration von Zellen. [6]

Heparin und Heparansulfat sind linear sulfatierte Polysaccharide, bekannt als Glykoaminoglykane. Die Interaktion von FGF-2 mit Heparinresten schützt das Protein vor Denaturierung (z. B. durch Hitze oder Säure) und Proteaseaktivität. Eine Reihe von klinischen Anwendungen sind im Zusammenhang mit FGF-2 untersucht worden. Vielversprechende medizinische Ansätze des FGF-2 bieten sich in der Förderung der Wundheilung und Angiogenese sowie für die Nervenregeneration. [18]

2.4 Bone morphogenetic proteins

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gehören zur Superfamilie der Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Die Bedeutung dieser Proteine für Regenerationsvorgänge in Geweben und Organen ist in den letzten Jahren zunehmend gewachsen.

Insbesondere in Studien zur fötalen Entwicklung nehmen sie eine wichtige Rolle ein und sind für die Entstehung und Differenzierung von Organen verantwortlich, wobei fehlende oder mutierte BMPs zu Missbildungen oder sogar zum Abort führen können. Auch im erwachsenen Organismus wird zunehmend die regenerative Bedeutung dieser Proteine erkannt. BMPs können zur Heilung von Frakturen und zur Behandlung von Gelenkerkrankungen beitragen. Bei degenerativen Gelenkerkrankungen weisen experimentelle Daten auf eine verminderte BMP-Expression im Knorpelgewebe hin. Deshalb könnten BMPs einen neuen, vielversprechenden Ansatz bei der Therapie dieser Erkrankungen darstellen. [7]

Bereits in den 60iger Jahren demonstrierten Urist und Kollegen im Tierversuch, dass Knochenbildung durch Autoinduktion möglich ist. Die subkutane Applikation von Proteinextrakten führte zu ektopischer Knochen und Knorpelinduktion. In nachfolgenden Analysen wurden sie als „Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)“ deklariert. [43]

Zu diesem Zeitpunkt wurde untersucht, ob es sich um ein einzelnes Protein oder um ein Zusammenspiel vieler Moleküle handelt. [42] Bekannt war, dass es sich um ein Glykoprotein handelt, welches nicht speziesspezifisch ist, da BMP aus einem Kaninchen in der Lage war, Knochenbildung in einer Ratte zu induzieren. Neun Jahre später wurden erstmals drei unterschiedliche BMPs rekombinant in *E. coli* und Säugertierzellen produziert (BMP-1, BMP-2A und BMP-3). [50]

Sequenzvergleiche zeigten die strukturelle Zugehörigkeit der BMPs zu der Proteinklasse der TGF- β . Inzwischen sind mehr als zwanzig verschiedene Typen solcher knochenwachstumsfördernder Proteine charakterisiert. Mittlerweile ist es auch gelungen, den genetischen Code zu entschlüsseln, der den Bauplan für die BMPs bereithält. Dies macht es möglich, die Proteine zu therapeutischen Zwecken mit gentechnischen Methoden herzustellen.

2.5 Eigenschaften der TGF- β Familie

Die Proteine der TGF- β Superfamilie stellen eine Gruppe von extrazellulären, multifunktionellen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren dar. Dabei korreliert die Anzahl der Familienmitglieder mit der Komplexität des Organismus. So wurden bis heute 5 zugehörige Proteine in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gefunden, 12 in dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und mehr als 30 verschiedene Mitglieder in Säugetieren. Bemerkenswert ist, dass die Proteine über alle Spezies hinweg einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen. [31]

Die Einteilung der TGF- β -Superfamilie erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien in der spezifischen carboxy-terminalen Domäne des Proteins. Die Subfamilie beinhaltet die growth and differentiation factors (GDFs). Weitere Untergruppen stellen die TGF- β -Proteine, Aktivins (Acts)/Inhibins (Inhs) sowie Nodal und die Müllerian inhibiting substance (MIS). Die BMPs bilden mit einem Drittel unter den bis heute identifizierten Mitgliedern die größte Gruppe. Lediglich BMP-1 bildet eine Ausnahme und ist stattdessen als eine C-Proteinase einzuordnen, die in den Prozess der Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen beteiligt ist.

Alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie werden als Vorläufermoleküle mit drei Untereinheiten sezerniert. Diese Vorläufermoleküle besitzen etwa das dreifache Molekulargewicht verglichen mit dem vollständig prozessierten Protein. Dazu zählen, die für den sekretorischen Prozess verantwortliche N-terminale, hydrophobe Signalsequenz (1. Untereinheit 15-25 AS) und eine Prodomäne stark variierender Größe (50-375 AS), welche für die Faltung, Dimerisierung und Regulation der Aktivität maßgebend ist. Während die Sequenzähnlichkeit gering ist, bleibt das Faltungsmuster hoch konserviert. Aus der carboxy-terminalen Domäne (3. Untereinheit) bildet sich das aktive Signalmolekül. [41]

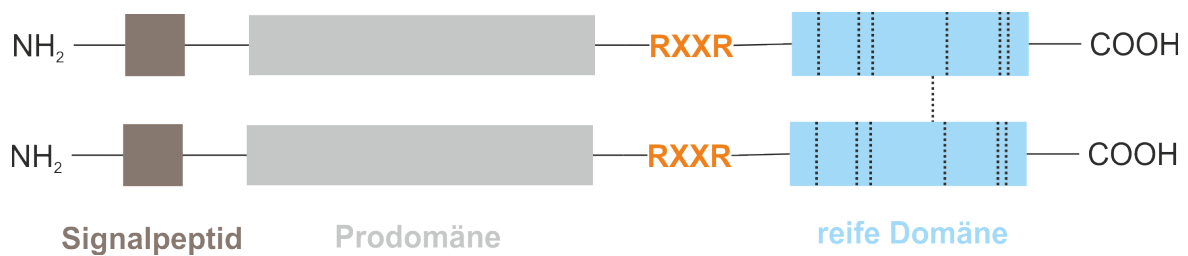


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung eines Prä-Proteins. Die Cysteine sind schwarz gestrichelt dargestellt.

Die Prodomänen der TGF- β -Superfamilie besteht aus einem hydrophoben Kern, der Teil einer sogenannten "Arm-Domäne" ist. Diese besteht aus mindestens sechs β -Faltblättern sowie einer α -Helix ($\alpha 2$ -Helix). Dabei kann sowohl die Growth-Faktor-Domäne als auch die Prodomäne glykosyliert sein. [41]

Durch die Anwesenheit der Prodomäne wird die korrekte Faltung des Proteins unterstützt und eine Dimerisierung von zwei Domänen gefördert. Funktionelle BMPs sind ausnahmslos Dimere, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere beschrieben sind. Nach der initialen Abspaltung des Signalpeptids erfolgt die Dimerisierung zweier Monomere durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen an Position 78. Nach der Glykosylierung, aber vor der Sekretion, wird das reife Protein proteolytisch durch eine Subtilisin-Ähnliche-Convertase an einem konservierten Motiv Arg-X-X-Arg gespalten. [14]

Die Tertiärstruktur eines BMP Monomers wird häufig durch das Modell einer linken Hand beschrieben: Die zwei antiparallelen β -Faltblätter, die in 9 β -Strängen organisiert sind, stellen die beiden Finger dar, wobei das zweite Faltblatt eine Überkreuzung beinhaltet und durch eine senkrecht dazu stehende α -Helix mit dem ersten Faltblatt verbunden ist. Der N-Terminus repräsentiert den Daumen und die α -Helix das Handgelenk. [11]

Charakteristisches Merkmal der 3. Domäne und damit aller BMPs sind sechs bis zehn konservierte Cysteinreste. Durch Disulfidbrücken wird ein sogenannter Cysteiniknoten gebildet. Er befindet sich in fast allen sekretorischen Glykoproteinen, die zu den Superfamilien TGF- β oder den Glykoprotein-Hormonen (GPH) gehören. [2] In der Betrachtungsweise der Linke-Hand-Struktur bildet der Cysteiniknoten die Handfläche des Proteins.

2.6 Das Cystein-Knoten Motiv

BMPs bilden einen charakteristischen Cystinknoten, der ein spezifisches Strukturmotiv darstellt, das in vielen Peptiden und Proteinen vorkommt. Intramolekulare Disulfidbrücken formen eine knotenähnliche Struktur, die die Polypeptidkette in einer definierten biologisch aktiven Konformation fixiert. [39] Diese besteht aus zehn Aminosäuren innerhalb der Growth-Faktor-Domäne. Mindestens sechs hoch konservierte Cysteinreste sind notwendig, um einen intramolekularen Cystinknoten zu bilden. Zwei dieser Disulfide generieren mit benachbarten Resten eine ringartige Struktur und die dritte Disulfidbrücke wird orthogonal durch die Ringebene aufgebaut. Dabei können sowohl die ringbildenden Disulfidbrücken als auch die Ringgröße (8-10 Aminosäuren) variieren. Zum einen verleiht dieses Motiv den Mitgliedern der BMPs eine außergewöhnlich hohe Stabilität, zum anderen ist diese Domäne von besonderer funktioneller Bedeutung, da es Teile der Bindeepitope für die Typ I und Typ II Rezeptoren beinhaltet. [2]

BMPs besitzen oft ein siebtes Cystein, welches eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einem zweiten BMP bildet und dadurch die Dimerisierung begünstigt. [14] Jedoch besitzen nicht alle Mitglieder der BMP-Familie das siebte Cystein (z.B. GDF-9, GDF-3), sodass es nicht essentiell für die Ausbildung der kovalenten Bindung und damit für die Dimerisierung ist. [14]

2.7 Bone morphogenetic protein 2

Humanes BMP-2 besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa und besteht aus 114 Aminosäuren. Die Growth-Faktor-Domäne beinhaltet die Cysteine 43, 47, 111 und 113 durch die sich der achtegliedrige Cysteinring bildet. Die dritte Disulfidbindung wird durch Cys14 und Cys79 geformt. Es entsteht der für die TGF- β s charakteristische Cystinknoten. Die Verknüpfung zum bioaktiven Dimer erfolgt zwischen den Cys78 beider Monomere. [11]

Die Struktur des nativen Proteins bildet sich aus dem Grundgerüst bestehend aus neun- β Strängen (β 1- β 9), einer α -Helix (α 3) und einem zusätzlichen β -Strang (β 5), der charakteristisch für BMP-2 ist. Dabei zeigen sich auf der Oberfläche des Dimers viele hydrophobe Bereiche, wodurch das Protein zur Aggregation neigt. An den „Fingerspitzen“ des Proteins ist dagegen eine ausgeprägte negative Ladung vorhanden und im Inneren des dimeren Proteins sowohl positive als auch negative Ladungen. [11]

Bei der Dimerisierung der BMP-2 Monomere kommt es zur Ausbildung von zwei Hohlräumen. Im ersten Hohlraum herrscht eine starke positive Ladung, die durch die beiden hineinragenden N-Termini entsteht. Von den jeweils sechs geladenen Aminosäuren der N-Termini sind fünf Aminosäuren basisch. Diese Eigenschaft ermöglicht es ihnen eine Heparin-Bindestelle auszubilden. Der zweite Hohlraum bildet sich durch beide Monomere an der aminoterminalen Seite der α 3-Helix, dem β 6-Strang, dem β 8-Strang sowie dem carboxy terminalen Ende. In ihr überwiegt eine negative Ladung. [11] In BMP Dimeren wurden zwei Typen von Rezeptor-Bindeepitopen identifiziert:

Das „*Wrist*“ Epitop, das die hochaffine Bindestelle für die Typ I Rezeptoren bildet und das zweite sogenannte "*Knuckle*" Epitop für die niederaffine Interaktion mit den Typ II Rezeptoren. Während das *Knuckle* Epitop, das auf der konvexen Seite der Finger beider Monomere lokalisiert ist, ein intramolekulares Epitop darstellt, wird das *Wrist* Epitop aus den Monomeren generiert. Durch die zweifache Symmetrie bei der Ausbildung des Dimers weisen diese je zwei *Knuckle* und zwei *Wrist* Epitope auf. Bei der Expression von BMP-2 in Säugerzellen kommt es zu einer Glykosylierung, wahrscheinlich an der Aminosäure Asn56. Diese Aminosäure ist in allen BMPs hoch konserviert und sitzt an der N-terminalen Seite der α -Helix. Nichtsdestotrotz hat sich gezeigt, dass in *E. coli* exprimiertes BMP-2 (ohne Glykosylierung) ebenfalls sowohl in vitro als auch in vivo aktiv ist. Das lässt darauf schließen, dass die Glykosylierung für die Funktion des Proteins nicht essentiell ist, nichtsdestotrotz kann die Glykosylierung Eigenschaften wie die Löslichkeit beeinflussen.

2.8 Bone morphogenetic protein 4

BMP-4 gehört zur TGF- β Familie und beeinflusst viele zelluläre Prozesse, angefangen von der frühen embryonalen Entwicklung bis zur Zellalterung. [8] Es nimmt eine Schlüsselrolle in der Bildung des mesenchymen Gewebes ein und inhibiert die neuronale Induktion und Entwicklung verschiedener Organe. [49][13][25]

Reifes BMP-4 ist ein homodimeres, sekretorisches, saures und hydrophobes Glykoprotein. [30] Es ist dem BMP-2 strukturell sehr nah verwandt mit einer Sequenzähnlichkeit von 83 %. Zwei Arten von BMP-4 wurden bisher im Menschen gefunden. Die eine Form wird unter anderem im reifen Plazentagewebe exprimiert, wobei das Vorläufer-Molekül eine Länge von 404 Aminosäuren aufweist. Damit unterscheidet es sich um vier Aminosäuren von der zweiten Form des Proteins, die im Osteosarkom (einem Knochtumor) gefunden wurde und

dessen Pro-Domäne vier Aminosäuren länger ist. In beiden Formen besteht das native Monomer jedoch aus 116 Aminosäuren und weist eine Molekulare Masse von annähernd 25 kDa auf. Außerdem beinhaltet die Growth-Faktor-Domäne in beiden Fällen sieben konservierte Cysteine, die zur Ausbildung des Cystinknotens und der intramolekularen Bindung mit dem zweiten Monomer führen. [27, 39] Wie alle Mitglieder der TGF- β -Familie sind BMP-4 nur als Dimere bioaktiv. Bevorzugt werden Dimere mit BMP-7 gebildet. Die Osteoinduktivität eines BMP-4/BMP-7-Komplexes ist deutlich höher als bei einem BMP-4 Homodimer. [40] Da sich die gentechnische Herstellung von BMP-4 deutlich schwieriger gestaltet als bei anderen BMPs, ist über die Funktionsweise von BMP-4 bis heute wenig bekannt.

2.9 Membranadsorber-Technologie

Für die Isolierung fermentativ hergestellter Pharmazeutika, z. B. von Antikörpern oder rekombinanten Proteinen, werden Prozessstrategien mit einer hohen Selektivität benötigt. Die Säulenchromatographie gehört aufgrund der hohen Ausbeuten, Reinheiten und Produktstabilitäten zu den etablierten Trennmethode. Hohe Adsorbekosten und kompliziertes Upscaling zeigen Nachteile für die großtechnische Herstellung rekombinanter Proteine.

Weitere Grundoperationen, wie die Flüssig/flüssig-Extraktion oder die Kristallisation, stehen im Fokus intensiver Forschung, um einen chromatographie-freies Downstream Processing zu ermöglichen. Bisher wurden mit diesen Methoden jedoch keine vergleichbar hohen Selektivitäten erreicht. Auf der anderen Seite werden neue stationäre Chromatographiephasen entwickelt, welche konventionellen Chromatographiesystemen eine höhere Produktivität ermöglichen. Dies gelingt durch die Vermeidung von Massentransport Limitierungen, welche aufgrund von Porendiffusion entstehen können. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren Membranadsorberstrategien entwickelt.

Die Integration der Membrantechnik in chromatographische Verfahren führte in den vergangenen Jahren zur Entwicklung innovativer Prozessierungseinheiten, den Membranadsorbern (MA). Auf der Oberfläche der Membranporen befinden sich spezifische Liganden, an die Proteine, Nukleinsäuren oder andere Komponenten binden können. [21] Durch die Vielzahl von Poren in der Filtrationsmembran stehen hohe Kapazitäten zur Verfügung. Vorteilhaft ist, dass das gesamte aufzutrennende Volumen die Poren passieren

muss und so im Gegensatz zu den Säulenchromatographiematerialien ein konvektiver Transport zu den funktionellen Austauscherguppen dominiert. Bei konventionellen Chromatographiematerialien erfolgt der Stofftransport zu den Liganden diffusionslimitiert. [4]

Die MA-Technologie verbindet die Vorteile konventioneller Säulenchromatographie hinsichtlich Trennleistung und Kapazität mit denen der Membrantechnik:

- hoher Durchsatz bei geringer Prozesszeit
- unkompliziertes Scale-up
- vergleichsweise geringe Herstellungskosten
- milde Reaktionsbedingungen
- einfache Handhabung

Prinzipiell sind MA mit jeder Art von Austauscherguppen (schwache, starke Kationenaustauscher, Anionenaustauscher und Affinitätsgruppen (Antikörper, Lectine etc.)) kombinierbar. Im Folgenden sind Beispiele funktioneller Liganden für Ionenaustauscher dargestellt.

Tabelle 2-1 Übersicht der funktionellen Liganden für Ionenaustauschermembranen.

[15]

Sulfonsäure (S-Typ)	Quarternäres Ammonium (Q-Typ)	Carboxyl (C-Typ)	Diethylamin (D-Typ)
$R-CH_2-SO_3^-$	$R-CH_2-N^+(CH_3)_3$	$R-COO^-$	$R-CH_2-N(C_2H_5)_2$
stark saurer Kationenaustauscher	stark basischer Kationenaustauscher	schwach saurer Kationenaustauscher	schwach basischer Kationenaustauscher

2.10 Partikelgängige Membranadsorber

Eine Weiterentwicklung der konventionellen MA stellen tangential überströmte MA in Wickelmodulform dar. Diese direct capture Membranmodule sind einsetzbar zur Behandlung Partikel-haltiger Lösungen (z. B. Zelllysate). In der Regel werden Zellen zunächst aufgeschlossen und durch Zentrifugation und/oder Filtration abgetrennt, damit aus der verbleibenden Flüssigkeit der gewünschte Stoff isoliert werden kann. Zur Vermeidung eines zusätzlichen Schrittes zur Partikel-Abtrennung passen sich innovative Aufarbeitungsstrategien diesen speziellen Anforderungen an. Dies ist besonders für rekombinante Proteine mit hoher Wertschöpfung interessant. Dazu zählt die Entwicklung maßgeschneiderter Membranen oder Module für die individuelle Reinigung von Zytokinen. Der Aufbau eines solchen Moduls wird in den folgenden Abbildungen schematisch beschrieben. Die Nutzung der tangential durchströmten Module bietet die Möglichkeit zur Einsparung von Prozessschritten aus partikel-haltigen Medien. Im Gegensatz zu klassischen MA, bei denen das Feed-Medium axial im dead-end-Modus durchströmt wird, werden direct capture Module mehrfach überströmt.



Abbildung 2-2 Herstellung und Produktion der Membranmodule. Beispiel für eine tangentielle Überströmung der Membran zur Adsorption aus partikelhaltigen Medien.

[20]



Abbildung 2-3 Strömungsrichtung eines klassischen Membranadsorbers (axiale Strömungsrichtung). [20]

Durchlässige Polymerspacer, die Membranlagen trennen, ermöglichen partikelhaltigen Feeds mit vergleichsweise hohen Flussraten das Modul zu passieren. Diese Bauart vermeidet das Verblocken der Poren und eröffnet Möglichkeiten zur Rezirkulation des Retentats. Das Retentat interagiert mit den Liganden in den Poren, während größere Partikel wie Zelltrümmer ungehindert das Modul durchlaufen.

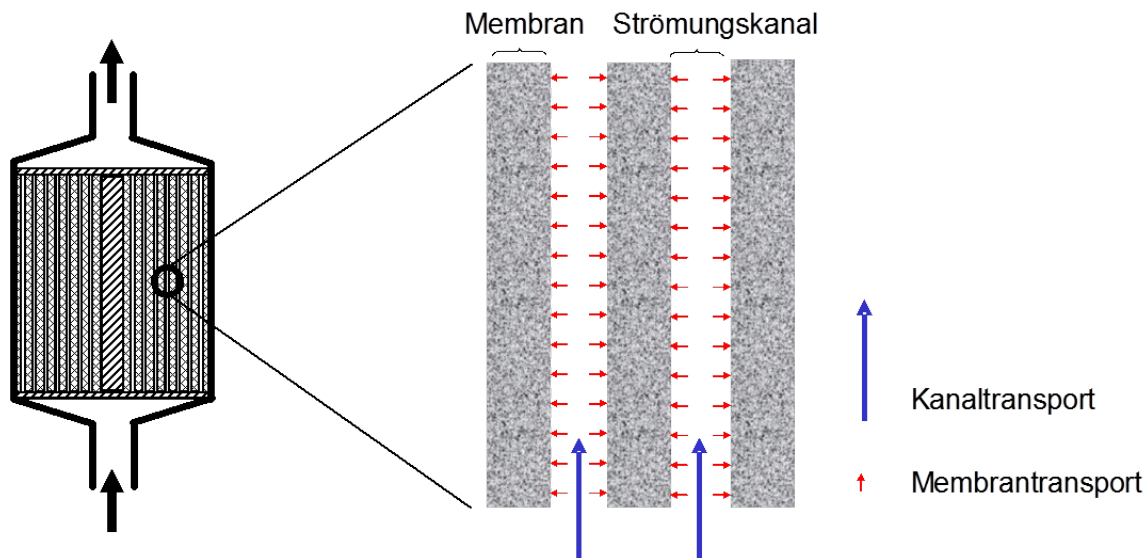


Abbildung 2-4 Strömungsrichtung eines Membranadsorbers (tangentielle Strömungsrichtung). [20]

2.11 Mixed mode Membranadsorber

Die klassische Ionenaustauschchromatographie erfordert die Einstellung des Feedstocks hinsichtlich pH-Wert und Leitfähigkeit, sodass dieser nicht immer direkt aus dem Bioreaktor übernommen werden kann. Die Bindungskapazität würde sehr gering ausfallen. Der pH-Wert wird in der Regel im Bereich zwischen pH 3 und pH 8 eingestellt. Die Leitfähigkeit, die häufig zunächst bei 15-20 mS/cm liegt, wird üblicherweise auf 5-7 mS/cm gesenkt. [16]

In der Praxis zieht das oftmals eine Verdünnung des Feedstocks nach sich. Im Labormaßstab ist dies zunächst akzeptabel, doch stellen Zellkulturvolumina von mehr als 10.000 Litern völlig andere Anforderungen. Schon die benötigten Puffermengen bringen neue Problemstellungen hinsichtlich Kosten und Lagerung. Idealerweise sollte somit eine nur minimale (oder gar keine) Verdünnung erforderlich sein, um eine hohe Kapazität und hohe Wiederfindung der Produkte zu gewährleisten. Hier liegt das hohe Optimierungspotential der klassischen Prozesschromatographie. Die mixed mode Membranchromatographie stellt eine potente Alternative der konventionellen Methoden dar.

Speziell für die Aufreinigung von Zytokinen aus Renaturierungsansätzen, die einen hohen Salzgehalt aufweisen, können neuartige, mixed mode Membranen eingesetzt werden. Auch hier soll die Anzahl der benötigten Schritte reduziert und die Produktivität des Gesamtprozess gesteigert werden. [17]

Mixed mode Interaktionschromatographie mit S oder C-Liganden basiert auf der klassischen Kationenaustauschchromatographie. Der Begriff mixed mode bezeichnet einen multiplen Retentionsmechanismus als Basis der Wechselwirkungen zwischen der Probe und dem Sorbens. Für die Experimente wurden MA entwickelt, die zwei Interaktionsmechanismen miteinander verbinden können. Innovative Plattformen lassen die Kombination aus hydrophoben Liganden und Kationenaustauscher zu. Bereits in den 1970er Jahren wurden erste Ansätze und Ideen zu mixed mode Liganden entwickelt, doch ließen sich diese nicht kommerziell im Prozessmaßstab verfügbar machen.

3. Zusammenfassung

Der Aufreinigungsprozess für das Zytokin FGF-2 ist einer der wenigen Prozesse, die schon auf der Applikation von Membranadsorbern basieren. Aus diesem Grund wurde das Downstream Processing dieses Zytokins als Modellprozess ausgewählt, um neuartige partikel-gängige Membranadsorber (Sartobind direct) als Alternative zu herkömmlichen Membranadosber zu untersuchen.

Zwei Membranadsorber mit unterschiedlicher Strömungskonfiguration wurden für das Downstream Processing des rekombinant produzierten Zytokins FGF-2 getestet. Ziel war die Effizienz der Aufreinigung zu optimieren, um das Downstream Processing ökonomischer zu gestalten. Dazu werden sowohl der handelsübliche Sartobind[®] S75 Membranadsorber (Sartorius AG, Göttingen), als auch der partikelgänige Prototyp vollständig charakterisiert. Das rekombinant produzierte Zytokin FGF-2 eignet sich als Modellprotein, da FGF-2 intrazellulär produziert wird. Standardmäßig werden hier die Zelltrümmer durch einen vorgeschalteten Zentrifugationsschritt abgetrennt, um ein Verblocken der Membran zu vermeiden. Tangential überströmte Membranadsorber bieten hierfür eine echte Alternative, da Zelltrümmer-haltiges Laysat direkt auf den Membranadorber appliziert werden kann. Spacer zwischen den Membranlagen verhindern, dass Zelltrümmer die Kanäle verstopfen. Dadurch können Prozessschritte eingespart werden.

Die Aufreinigung von FGF-2 ist mit einem handelsüblichen Sartobind[®] S75 Kationenaustausch-Membranadsorber (Sartorius AG, Göttingen) etabliert. Dieses Modul hat eine axiale Strömung. Die Membranlagen sind übereinander geschichtet, sodass Zellpartikel vor der Aufreinigung entfernt werden müssen, da es sonst zum Verblocken der Kanäle kommt.

Der Prototyp Sartobind direct zeichnet sich durch eine tangentielle Strömungsgeometrie aus. Hier wird die Membran nicht durchströmt, sondern überströmt, was die Anwendung für partikelhaltige Zellysat-Lösungen erlaubt. Beide Membranadsorbertypen besitzen die gleichen Liganden, die eines starken Kationenaustauscher. Sie unterscheiden sich aber in ihrem modularen Aufbau.

Der konventionelle Aufreinigungsprozess beginnt mit dem Zellaufschluss, gefolgt von der Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation. Das intrazellulär gebildete FGF-2 befindet sich so im Kulturüberstand und kann partikelfrei auf ein MA-Modul appliziert werden. Alternativ kann im Falle des partikelgängigen MA der Zentrifugationsschritt übersprungen werden und der MA direkt mit Probe beladen werden. Die Feinreinigung (Polishing) erfolgt in beiden Prozessen mittels Anionenaustauscherchromatographie, um Endotoxine abzureichern. Das Produkt wird anschließend auf Bioaktivität getestet.

Ziel war es die Effekte zu untersuchen, die die Aufreinigung beeinflussen, um die Effektivität der Aufreinigung beider Module zu vergleichen. Erste Experimente dienen zunächst der Charakterisierung und Bewertung der Module. Entsprechend soll aufgeklärt werden, welcher Modultyp besser für die Isolation von FGF-2 geeignet ist. Dazu werden die Bindungskapazität des tangentialen Moduls untersucht und mit Sartobind[®] S75 Membranadsorber (Sartorius AG, Göttingen) verglichen. Die Isolierung von FGF-2 unter Realbedingungen vervollständigt die Betrachtungen.

Um die potenziellen Anwendungsmöglichkeiten beider Membranen bewerten zu können, wird die Bindungskapazität betrachtet. Dazu werden Durchbruchkurven (DBC) von FGF-2 ermittelt. Die DBCs der Module werden erhalten, indem reine FGF-2 Lösungen mit unterschiedlichen Flussraten auf die Membran gegeben werden. Das axial angeströmte Sartobind[®] S75-Modul erreicht dynamische Bindungskapazitäten bei 10%iger Auslastung von 6 mg/ml. Im Gegensatz dazu ist die Kapazität des tangentialen Moduls niedriger und erreicht nur eine dynamische Bindungskapazität von 3,3 mg/ml. Zusätzlich ist die dynamische Bindungskapazität auch von der Flussrate abhängig. Höhere Bindungskapazitäten werden mit dem axialen Modul erreicht, das bedeutet der Aufbau des Sartobind direct Modul hat einen großen Einfluss auf das dynamische Bindungsverhalten der Proteine. Ähnliche Tendenzen sind bei der Betrachtung der statischen Bindungskapazität festzustellen. Die statische Bindungskapazität des axialen Moduls beträgt 27 mg/ml. Dies ist 50% höher als die statische Bindungskapazität des tangentialen Moduls unter partikelfreien Bedingungen (18 mg/ml) und 150% höher als die statische Bindungskapazität unter partikelhaltigen Bedingungen (11 mg/ml).

Es kann festgestellt werden, dass das tangentialen Modul in der rezirkulativer Betriebsweise im Vergleich zu Durchfluss oder *single-pass* Anwendungen niedrigere Bindungskapazitäten kompensieren kann. Trotzdem ist die Kapazität eines tangentialen Moduls, auch in

rezikulativer Betriebsweise nicht höher, als die Bindungskapazität eines axialen Moduls. Eine Möglichkeit ist, dass Proteine oder Peptide die Zugänglichkeit der Liganden blockieren. Auch Peptidoglykane oder Oligosaccharide, die im Zelllysate vorhanden sind, könnten als mögliche Gegenionen fungieren und kompetitiv um die Bindungsstellen konkurrieren.

Die Reinheit von FGF-2 war bei beiden Modulen vergleichbar und liegt bei etwa 80%. Insbesondere die Auflösung der Elutionspeaks zeigt, dass mit dem axialen Modul die Peakform deutlich schärfer ist. Hier limitieren die Diffusionseffekte die Trennschärfe des tangentialen Moduls, was zu niedrigeren Produktkonzentrationen führt.

Jedoch wird das Zielprotein in einem Schritt direkt aus dem Zelllysate gebunden und benötigt keine zusätzlichen Zentrifugationsschritte. Ein Prozessschritt kann so übersprungen werden, was insbesondere hinsichtlich des Up-Scalings einen entscheidenden Vorteil bringen kann. Im größeren Maßstab könnte also eine geringere Bindungskapazität in Kauf genommen werden. Abhängig vom Proteinverlust während der Filtration/ Zentrifugation und der Prozess, muss abgeschätzt werden, ob der Prozess trotzdem noch ökonomisch betrieben werden kann. Die partikelgängigen Membranadsorber stellen somit eine sinnvolle Alternative zu herkömmlichen Membranadsorbentien dar.

Considerations on the flow configuration of membrane chromatography devices for the purification of high-value bioactives

Gesa Gieseler^a, Iliyana Pepelanova^a, Annette Meyer^a, Louis Villain^b, Sascha Beutel^{‡a}, Ursula Rinas^a Thomas Scheper^a

^a Institute of Technical Chemistry, Gottfried Wilhelm Leibniz University, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany

^b Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Straße 11, 37079 Göttingen, Germany

[‡] Corresponding author: Tel.: +49-511-762-2868; E-mail address: beutel@iftc.uni-hannover.de

3.1 Abstract

Membrane chromatography possesses numerous advantages like operation at high flow rates, low back pressure, ease of handling and scale up, which make the membrane adsorber process a viable alternative to conventional packed column chromatography. A purification process for the isolation of human recombinant basic fibroblast growth factor (FGF-2) based on membrane chromatography was investigated using devices with different flow configurations. In the first process, the cytokine capture step was performed with an axial flow device, while the alternative method achieved direct capture of FGF-2 from unclarified cell lysate with a tangential flow device. In both processes, FGF-2 purities exceeded 82% and the purified cytokine displayed high biological activity. Total binding capacity of the axial flow device was 27 mg/ml. This was 50% higher than the total binding capacity obtained with the tangential flow device under particle-free supernatant conditions (18 mg/ml) and 150% higher than the total binding capacity achieved with unclarified cell lysate (11 mg/ml). While membrane chromatography in tangential flow mode integrates clarification and protein capture into one single unit operation and thus reduces the number of stages in the downstream process, it displays lower peak resolution and leads to a lower overall process yield.

Keywords: *membrane chromatography, axial flow device, tangential flow device, membrane adsorber, direct capture, FGF-2*

3.2 Introduction

Membrane chromatography offers many advantages for the design of cost-effective downstream processing. [38] It is frequently used for polishing applications in biotechnological processes for the fast processing of large volumes of solutions. Since transport of solutes takes place predominantly by convection, mass transfer is very swift, leading to quick processes, high flow rates, low buffer consumption and low back pressure. In addition, membrane adsorber modules are easily upscaled and can be disposed after use, thus eliminating cleaning and regeneration steps, as well as simplifying process validation. The major disadvantage of membrane chromatography is the lower binding capacity in comparison to resin-based column chromatography. However, constant development of membrane adsorbers has led to improved performance, sometimes close to established chromatography resins.

Another interesting feature of membrane adsorbers is that they can be produced with different flow configurations. Here, we compare two different membrane devices for the purification of human basic recombinant fibroblast growth factor (FGF-2). In the first approach, a stacked-disk device exhibiting axial flow is used for protein capture and purification, while the second process employs a tangential flow device which allows the processing of unclarified cell lysate. Our aim was to examine and compare these different membrane chromatography strategies to reveal which approach leads to a more efficient downstream process for the purification of FGF-2. The tangential flow device allows direct capture of the target protein from unclarified cell lysate, thus integrating clarification and purification and reducing the overall number of unit operations. The architecture of the direct capture device allows the processing of particle-containing solutions, but introduces film diffusion-dependant transport of solutes to the ligands in the membrane pores. The axial flow device can be used with particle-free solutions only and displays predominantly convective transport.

Axial flow devices with convective transport to ligands display the above-mentioned, classical strengths of membrane chromatography. Tangential flow devices, on the other hand, are an attempt to perform direct isolation of bioactive components from industrial waste streams and fermentation broths, and open up new possibilities for the design of efficient downstream operations. Therefore, membrane chromatography with tangential flow has been recently investigated by several research groups. In food industry applications, it has been implemented for the recovery of bioactive proteins from industrial potato fruit juice [56] or for the separation of glycosylated caseinomacropetide from skim milk whey. [55] In the area

of recombinant technology, Orr et al. used the integration of tangential flow and membrane chromatography to obtain a one-step purification of an extracellularly produced enzyme. [54]

In this paper, membrane chromatography devices with different flow configurations are implemented on the same process for the production of bioactive FGF-2 (Fig. 3-1). After cell disruption, the cell lysate is clarified by centrifugation before application of the particle-free supernatant to the axial membrane adsorber. In the alternative process, the centrifugation step is omitted and the unclarified cell lysate is directly loaded to tangential flow device. Both membrane adsorber devices contain the same strong cation-exchanger membrane and differ in their format only, thus resulting in different processing setup. A polishing step with anion-exchange membrane chromatography follows the capture stage in both cases. This operation was included to ensure DNA and endotoxin removal from the final product prior to consequent bioactivity testing. The article concludes with a discussion of the advantages and limitations of each membrane chromatography device.

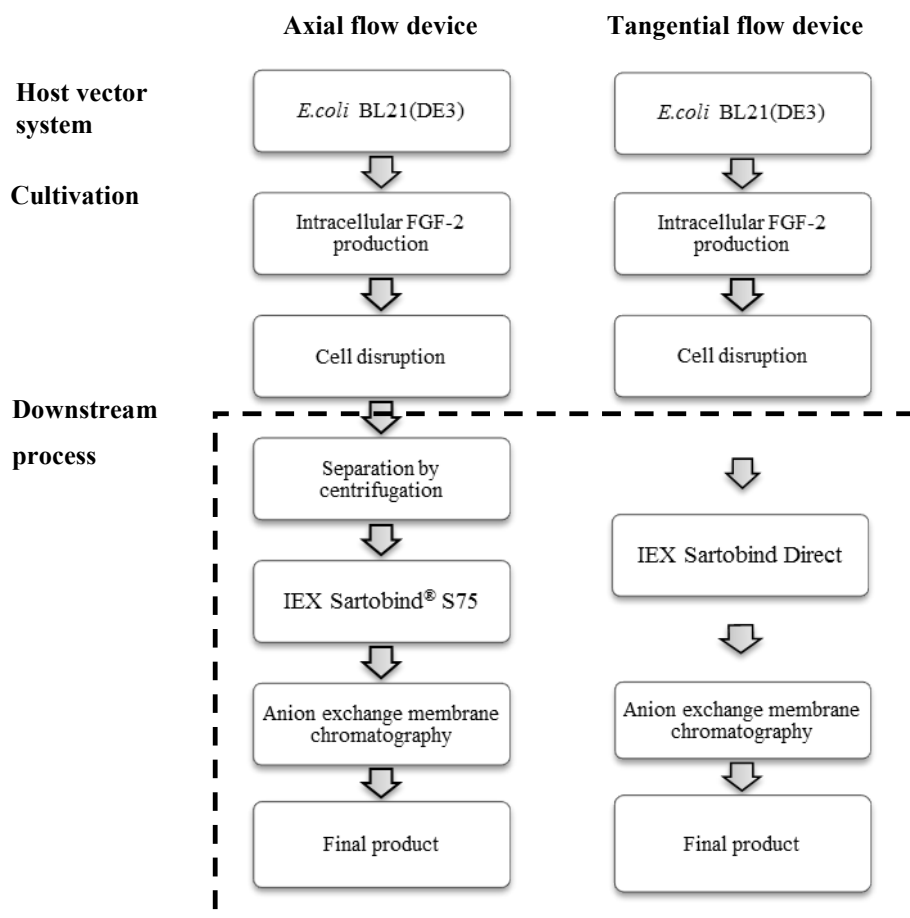


Figure 3-1 The purification process of FGF-2 from the soluble lysate using two different membrane chromatography devices.

3.2 Material and methods

Plasmids and strains

The study used *E. coli* strain BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, Germany) transformed with the plasmid pET29c(+)-hFGF-2 which contains a cDNA encoding for human basic fibroblast growth factor (155aa) [57]. The FGF-2 coding sequence was previously described by Knoerzer et al. [58]. The strain was stored as a glycerol stock [50% v/v] at -80 °C.

Cultivation methods

Cultivation was performed as previously published. [10] LB-medium supplemented with 30 µg/ml kanamycin was used as a preculture medium. The preculture was incubated on a rotary shaker at 30 °C, 120 rpm for 13 h and then directly used to inoculate the bioreactor. The medium was autoclaved at 121 °C. The kanamycin solution was sterilized by filtration (0.2 µm). Cultivations were carried out at 30 °C in a 2 L stirred tank reactor (Biostat B, B. Braun Biotech, Melsungen, Germany). Cells were harvested by centrifugation at 4,000 x g for 20 min and 4 °C. A 20 g cell pellet was resuspended in 100 ml lysis buffer [25 mM phosphate buffer pH 7.5, 3 mM DTT, 1 mM EDTA] [10]. Suspended biomass was disrupted with a high pressure homogenizer (M-110L, Microfluidics, Newton USA) at 9,000 psi.

Membrane chromatography devices

Two types of membrane chromatography devices with distinct flow configurations – a stacked disc device with axial flow and a tangential flow device for direct capture were used. The axial flow device (Sartobind[®] S75) contains 15 membrane layers, which represents a bed volume of 2.1 ml and a total active surface area of 75 cm². The tangential flow device (*Sartobind Direct*) is a prototype provided by Sartorius (Göttingen, Germany), in which the membrane material is wound around a solid polypropylene core together with a non-woven spacer. The bed volume of the tangential flow device is 3.3 ml with a total active surface area of 120 cm². In both devices, the membrane chromatography material consists of a strong cation exchanger (sulfonic acid ligands, stabilized reinforced cellulose, pore size 3-5 µm).

Downstream processing

The purification of FGF-2 was performed using a low pressure ÄktaPure (GE Healthcare, Sweden) chromatography system with an online UV absorbance detector at 280 nm and conductivity meters. The principal setup is shown in Figure 2-2. Data were recorded using the accompanying software Unicorn (GE Healthcare, Sweden). All runs were operated at a flow rate between 1-10 ml min⁻¹.

In some experiments, external loading of the tangential flow membrane adsorber was performed. This was carried out with an auxiliary pump device (IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Germany) in recirculation mode for 20 min and with a flow rate of 10 ml min⁻¹. Elution steps were performed on the ÄktaPure. The loading/wash buffer was composed of 25 mM phosphate buffer (pH 7.5) with 3 mM DTT and 1 mM EDTA. The elution buffer was prepared with the same recipe as the loading/wash buffer with additional 1 M NaCl. All

buffers were prepared with deionized water, degassed and filtered with 0.2 μm polypropylene filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Regeneration of the membrane devices was performed with 10 column volumes of a 1 M NaOH.

Samples loaded on the tangential flow device always had a volume of 30 ml and included particle-free supernatant or unclarified lysate from the recombinant production of FGF-2 (section 3.2).

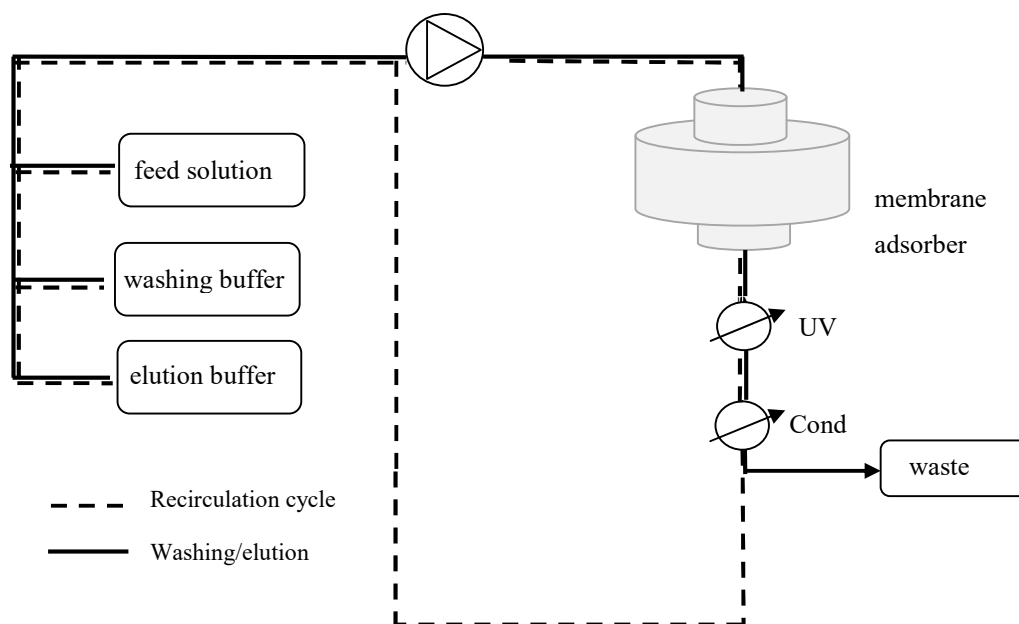


Figure 3-2: Experimental setup for FGF-2 purification with the membrane chromatography devices on the ÄktaPure liquid chromatography system. The solid line represents conventional chromatography steps (single pass mode, flow-through), while the dotted line represents recirculation loading mode.

An anion exchange membrane adsorber module (Sartobind[®] Q 75, Sartorius, Göttingen, Germany) was used for endotoxin removal. The adsorber unit was washed sequentially with 0.1 M KOH containing 20% (v/v) ethanol, 1.5 M NaCl and pyrogen-free water to render it endotoxin-free prior to operation.

Determination of dynamic binding capacity

Dynamic binding capacity (DBC) was determined under optimal conditions using pure FGF-2 standard. DBC at 10% breakthrough was defined as the amount of bound protein per membrane surface area until 10% of the flow-through protein concentration of the loading solution is measured in the flow-through $c/c_0=0.1$. Here c is the concentration of FGF-2 in the flow-through and c_0 is the concentration of protein in the loading solution. Accordingly, dynamic binding capacity 100% was defined as DBC 100%, when the ratio $c/c_0=1.0$ was achieved.

FGF-2 quantification

The concentration of purified FGF-2 (MW: 17 kDa) was determined by UV absorbance at 280 nm, using $15,930 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as the molar extinction coefficient. This value was calculated from the FGF-2 amino acid sequence on the ExpASY website using the Prot-Param program (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Fractions were also analyzed for the relative purity of FGF-2 by gel densitometry, stained with Coomassie Brilliant Blue and analyzed using *ImageJ* software (National Institute for Health, USA). Commercially available FGF-2 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) (750, 500, 250, 125 $\mu\text{g/ml}$) was used as a standard protein. Total protein concentration was determined via Bradford assay with BSA as standard protein.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in a Mini Protean Tetra cell[®] (Bio-Rad, München, Germany) using a 12% polyacrylamide separating gel. Loading amount was 7 μl for chromatography fractions. Gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue solution (Neuhoff et al., 1988). Destained gels were scanned on an Epson perfection V750 pro scanner.

Endotoxin assay

The endotoxin content of purified FGF-2 was determined by the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. The test was carried out using an Endosafe[®]-PTS[™] system (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) with a cartridge ranging from 0.1-10 EU ml^{-1} (EU = endotoxin unit) and following the manufacturer's instructions.

Bioactivity assay

The biological activity of FGF-2 was tested using NIH-3T3 fibroblast cells (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). Cells were seeded in 96-well plates in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS and 1% penicillin-streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) with an initial cell density of 4000 cells/well. After seeding, the cells were starved for 24 h in DMEM with 1% FCS and then cultivated in FGF-2-containing media for 52 h. Cells cultivated in culture medium without FGF-2 served as a negative control. For the indirect estimation of cell proliferation, the CellTiter-Blue cell viability assay (Promega, Southampton, UK) was performed. The visible light absorbance properties of CellTiter Blue undergo a “blue shift” upon reduction of the indicator dye Resazurin into the highly fluorescent colored Resofurin (Excitation 579 nm/Emission 584 nm) (Ansar Ahmed et al., 1994). The fluorescence intensity is directly proportional to the number of viable cells. Fluorescence measurements were performed on the Fluoroskan Ascents microplate reader (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) and results are presented as percentage of the negative control.

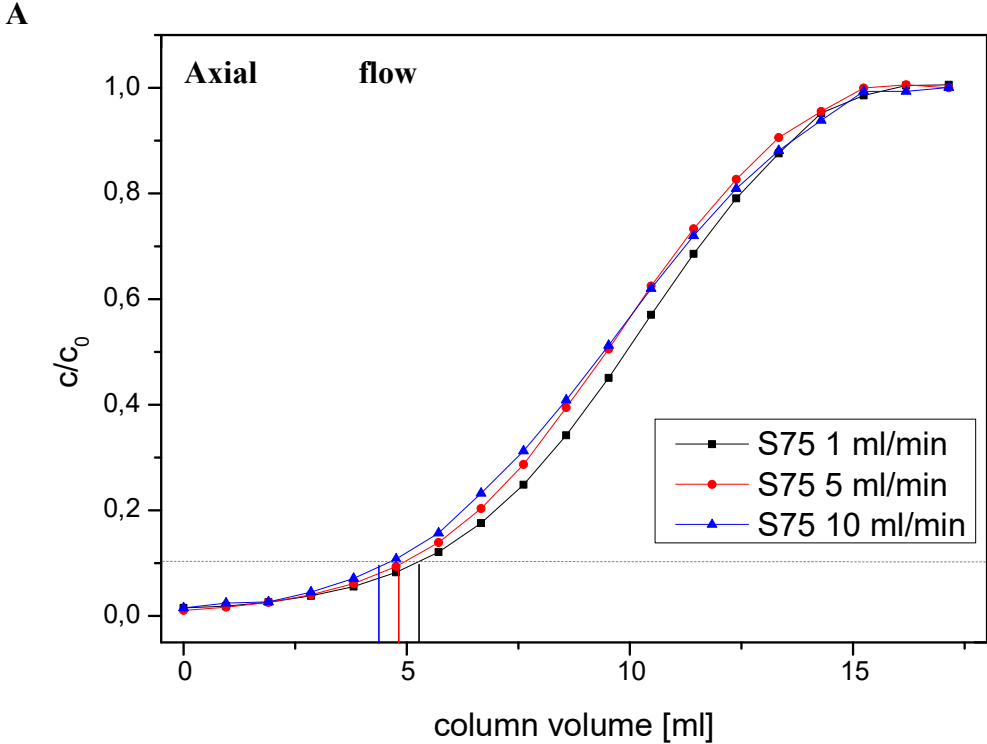
3.3 Results and discussion

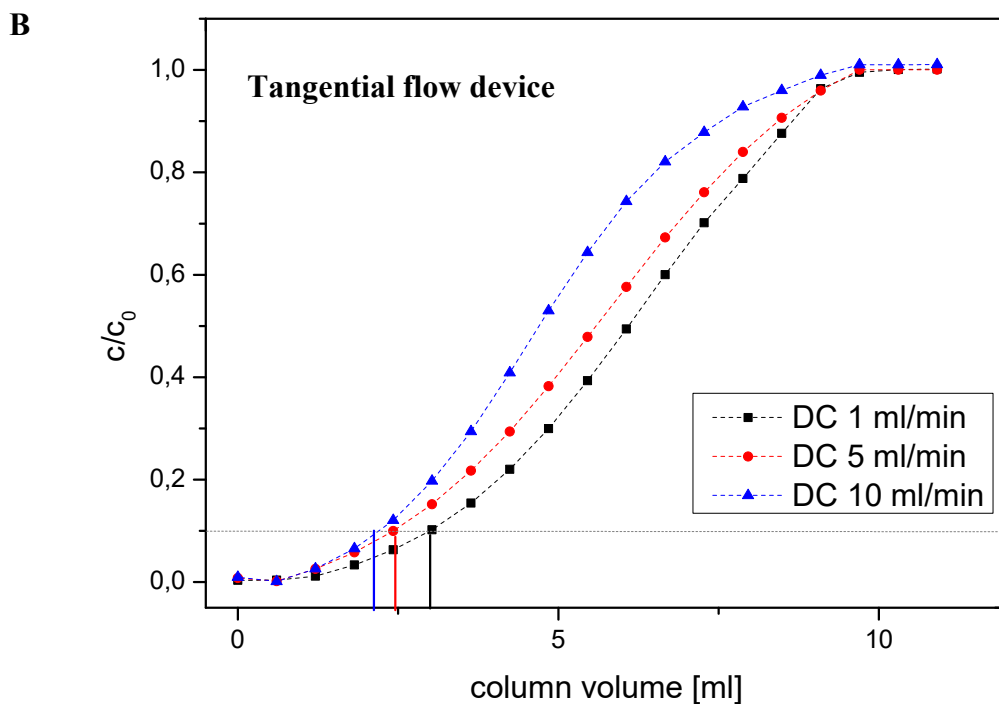
Breakthrough and dynamic binding capacity analysis of the membrane adsorbers

A series of experiments allowed the dynamic binding capacity (DBC) of the membrane modules to be determined. The breakthrough values of the cation exchange membrane adsorbers were obtained using pure 2 mg/ml FGF-2 solution at different flow velocities. Fig. 3 shows the dynamic breakthrough curves for the axial flow device (Fig. 3-3A) and the tangential flow device (Fig. 3-3B).

In total, 60 mg FGF-2 were loaded onto the membranes. The dynamic binding capacities (DBC) of the axial flow module were independent of the flow rate (see Fig. 3-3A and C). The average DBC of the axial flow device was 6 mg/ml at 10% breakthrough and 9 mg/ml at 100% breakthrough, which corresponds to saturation of binding sites. (see Fig. 3-3A and C). In the tangential flow device, mass transport of molecules to the binding sites takes place predominantly by diffusion. In this membrane adsorber configuration, dynamic binding capacities decreased with higher flow rates (see Fig. 3-3B and C), which accounts for diffusion limitation. Consequently, an increase of binding capacity can be achieved by

loading in recirculation mode. In further experiments, recirculation mode was used for loading, in order to compensate for solute losses of protein in the tangential flow mode.





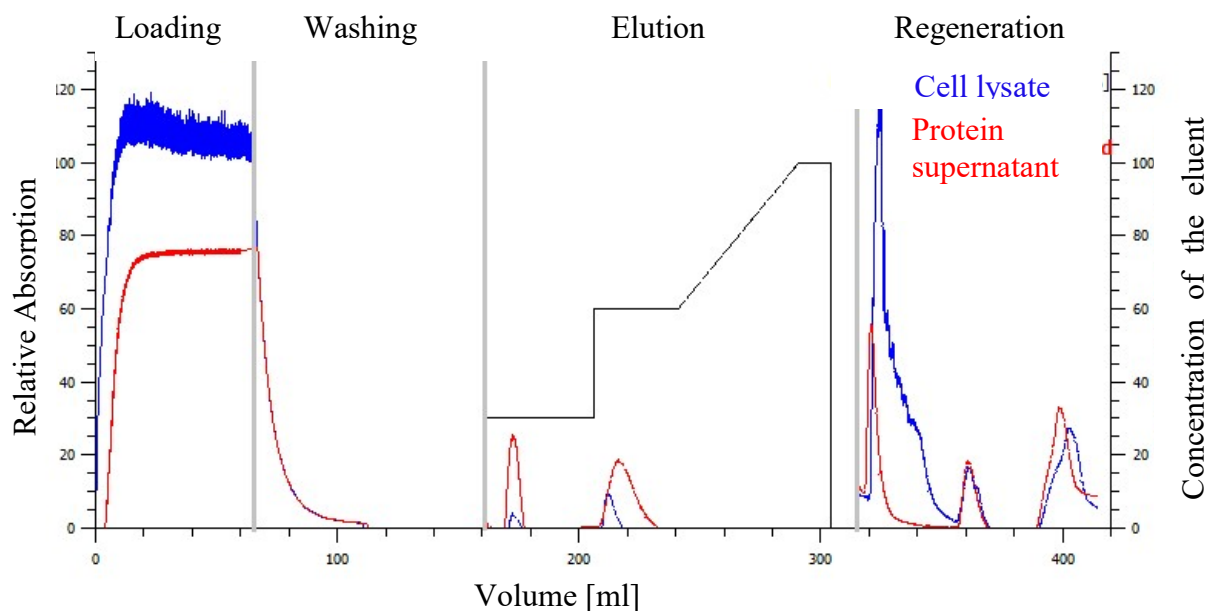
C

	Flow rate [ml/min]	DB _{10%} [mg/ml]	DB _{100%} [mg/ml]♣
Axial flow device	1	6.0	9.3
	5	6.0	8.9
	10	6.0	8.9
Tangential flow device	1	3.3	5,5
	5	2.6	5.2
	10	1.9	5.2

Figure 3-3: Dynamic breakthrough curves using 2 mg/ml FGF-2 to nearly 100% breakthrough at different flow rates. c/c_0 is the relative FGF-2 concentration measured via UV absorbance at 280 nm. Comparison of the direct capture tangential flow device against the axial flow device in single pass mode. FGF-2 solution was centrifuged and filtered before loading. A: DBCs of the axial flow device with different flow rates 1/5/10 ml/min. B: DBCs of tangential flow device with different flow rates 1/5/10 ml/min .C: Comparison of axial flow device with tangential flow device.

FGF-2 purification performance

The experiments described so far characterized the operation performance of the membrane adsorbers with the pure FGF-2 protein. The next step in the investigation was to apply the membrane chromatography devices for the purification of the cytokine FGF-2. Samples of particle-free supernatant or unclarified cell lysate were directly loaded on the tangential flow prototype. Although the tangential flow device is intended for operation with particle-containing solutions, both conditions were tested with the device in order to compare performance. Desorption was performed in three steps and resulted in a large FGF-2 peak at 60% elution buffer (see Fig. 3-4). Compared to crude protein amount (analyzed by the Bradford assay), the single fractions contained highly enriched FGF-2 (~82% as determined by densitometry, see Table 1A and 1B).



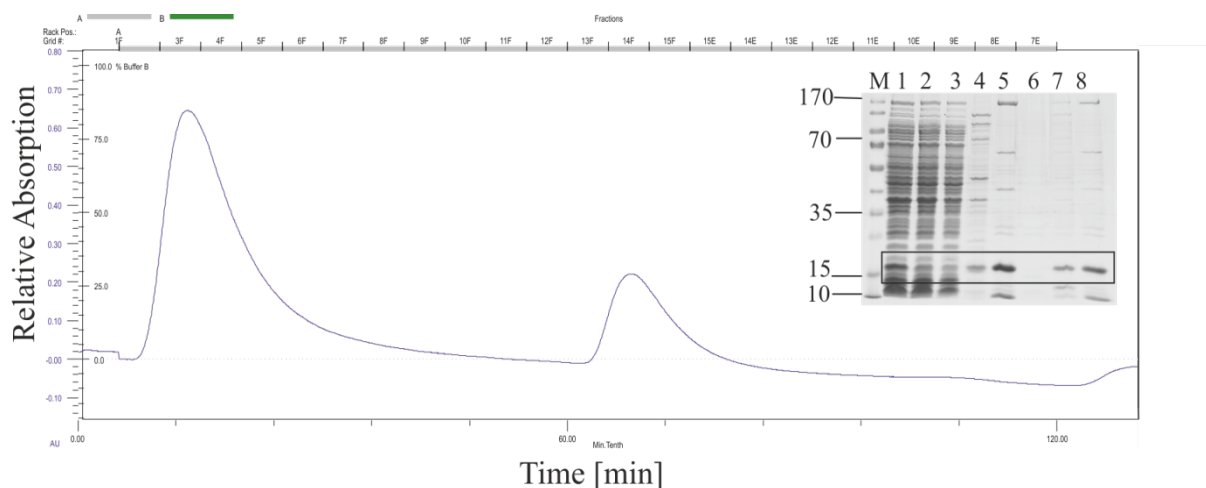


Figure 3-4: A: Purification of intracellular FGF-2 using the tangential flow membrane device. UV absorbance is indicated by the blue and red line, monitoring direct capture membrane performance with unclarified cell lysate (blue) and particle-free supernatant (red), respectively. B: Zoomed elution profile with unclarified cell lysate (blue line). The cell lysate contained ca. 5 mg ml⁻¹ FGF -2 solution and was loaded on the membrane at flow rates of 10 ml/min. The blue line monitors UV absorption. Retention time of FGF-2: 60 min (at 60% elution buffer). SDS-PAGE: Process overview of different steps during FGF-2 purification; M: protein ladder (prestained protein ladder, Thermo Scientific); 1: breakthrough t = 0 min (dilution 1:2); 2: breakthrough t = 20 min (dilution 1:2); 3: Washing; 4: Elution fraction 3F; 5: Elution fraction 14F (single fraction FGF-2); 6: Elution fraction 9E; 7: Elution fraction 2F-7E; 8: Elution fraction 13F-15E (total FGF-2 peak).

Protein amount analyzed by Bradford protein assay and gel densitometry (Table 3-1A and 1B) indicated a decrease in the total amount of bound protein, whereas the purity of FGF-2, determined by gel densitometry, remained constant.

Table 3-1 A: Summary of FGF-2 purification with particle-free supernatant and the tangential flow device; loading was performed in recirculation mode (see Fig. 2-2) B: Summary of FGF-2 purification with unclarified lysate and the tangential flow device; loading was performed in recirculation mode (see Fig. 2-2) C: Summary of FGF-2 purification with particle-free supernatant and the axial flow device, loading was performed in single pass mode.

A						
Tangential flow device	Volume [ml]	Protein conc. ^a [mg/ml]	Amount total protein ^a [mg]	Total amount of target protein ^b [mg]	Purity of target protein [%] ^b	Recovery of FGF-2 [%]
Supernatant	30	25.1	753	71.2	9,1	100
Total Elution	30	1.95	58.5	36.6	62	52
Purified Peak	5	7.63	32.8	27.0	82	73
B						
Tangential flow device	Volume [ml]	Protein conc. ^a [mg/ml]	Total amount of loaded protein ^a [mg]	Total amount of target protein ^b [mg]	Purity of target protein [%] ^b	Recovery of FGF-2 [%]
Lysate	30	29.1	873	75.2	9,0	100
Total Elution	30	1.27	38.0	20.1	53	27
Purified Peak	5	3.64	18.2	14.9	82	74
C						
Axial flow device	Volume [ml]	Protein conc. ^a [mg/ml]	Amount total protein ^a [mg]	Total amount of target protein ^b [mg]	Purity of target protein [%] ^b	Recovery of FGF-2[%]
Supernatant	30	26.1	785	74.9	9,5	100
Total Elution	30	1,85	55.5	39,1	70	52
Purified Peak	2.5	12,3	30.8	26.6	86	68

^a protein concentration determined via Bradford assay using BSA as a standard protein

^b protein concentration determined via densitometry calibration curve with pure FGF-2 as a standard protein

Protein purification performance of the tangential flow device was compared to the commercially available device with axial flow. Regarding the latter, the axial flow device led to higher concentrations of the eluted target protein (see Table 3-1C). Purity was comparable with the tangential flow device.

Although an investigation of the permeability of the tangential flow device for cell-containing feed streams was performed and shown to be provided (data not shown), premature clogging definitely has an influence on the binding capacity, which results in a decrease of the total amount of protein captured by the device. This could indicate blocking of the ligands of the adsorber device caused by other minor proteins or peptides. Another explanation could be the high amount of peptidoglycans and oligosaccharides which are found in *E. coli*. Organic material in the sample can act as a counterion or competitive ion and can have an influence on

the adsorption behavior of FGF-2. Kreuß et al. investigated several reasons for increased fouling during direct capture mode. [55]

Since recirculation mode is used to compensate the loss of protein at 100% breakthrough, the static binding capacity was also determined. A comparison of the static binding capacities (see Fig. 3-5A) illustrates decreased amount of eluted protein achieved in direct capture mode with unclarified lysate as the starting material. The static BC values were determined by the Bradford assay and represent total protein amount, while the values for dynamic BCs were measured with pure FGF-2 solution by UV absorbance at 280 nm (see Fig. 3-3C). This fact should be considered when a comparison between the binding capacities is made.

The BC data obtained (see Fig. 3-5A) corresponds to the relative UV absorptions shown in the chromatograms (see Fig.3-4A). The axial flow device clearly shows the highest static and dynamic binding capacity (see Fig. 3-3C and 3-5A). Use of the tangential flow mode under unclarified lysate conditions resulted in a slightly lower static BC compared to working with tangential flow mode with a cell-free supernatant and indicates that binding sites become less accessible in the presence of cells.

If the elution peaks obtained with the membrane devices are compared (data not shown), it is evident that the axial flow device leads to higher peak resolution and concentration of the eluted target molecule. The elution peaks obtained with the tangential flow device are broader, indicating the existence of film diffusion effects. Thus, while the axial flow device is more efficient for FGF-2 purification, the tangential flow device does allow for cytokine purification with a reduced number of unit operations.

Fig. 3-5 illustrates further the differences between the pooled fractions using the tangential flow device and the axial flow device.

Membrane module	Sample	BC ₁₀₀ % [mg/ml]
Tangential flow device	Unclarified cell lysate	11
Tangential flow device	Particle-free supernatant	18
Axial flow device	Particle-free supernatant	28

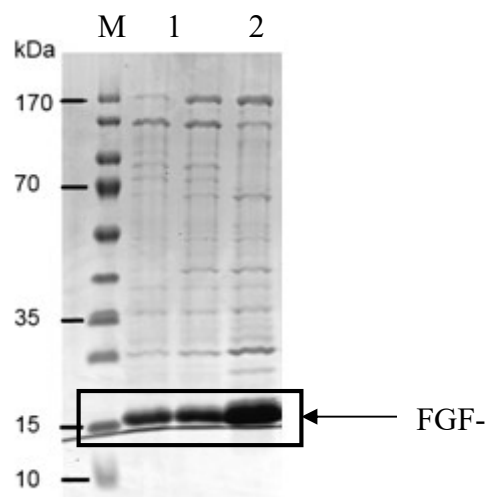


Figure 3-5: A: Summary of the static binding capacities. Comparison of the different initial loading modes with particle-free supernatant and unclarified cell lysate as a starting material. B: SDS-PAGE analysis of 3 different initial loading systems. Lane 1: Tangential flow device with unclarified cell lysate; Lane 2: Tangential flow device with particle-free supernatant; Lane 3: Axial flow device with particle-free supernatant.

The operation of the tangential flow device with either unclarified cell lysate or particle-free supernatant had a minor impact on the purity of the fraction but affects the overall process yield obtained. The axial flow device led to the highest concentration of FGF-2 in single and pooled fractions, analyzed via SDS-PAGE analysis as shown in Fig. 3-5. On the other hand, purity remained nearly unchanged (see Table 3-1).

Endotoxin Removal

The final step in the process is the removal of endotoxin. For this purpose, an anion exchange membrane adsorber module (Sartobind[®] Q75, Sartorius, Göttingen, Germany) was used. In total, 10 ml FGF-2 solution were loaded on 2.1 ml bed volume membrane adsorber. The reduction of endotoxin is expressed with the log reduction value (LRV) which is the

logarithmic quotient of the sample solution containing endotoxin, divided by the concentration of the filtered solution. Endotoxin clearance was achieved with a 4 log removal in the anion exchange step. The endotoxin content of the final product was quantified at 0.377 EU ml^{-1} (or $0.00754 \text{ EU } \mu\text{g}^{-1}$ protein) with a yield of 93%.

The endotoxin level is a critical parameter for cytokines used in cell culture. Since endotoxin content was reduced to an extremely low level (0.377 EU/ml), the purified product can be accepted for cell culture applications ($< 0.5 \text{ EU/ml}$ as specified by the FDA (U.S. Food and Drug Administration, www.fda.gov)). [36]

Biological activity test

Mitogenic activity of the purified FGF-2 was analyzed by a bioassay of the proliferation of NIH-3T3 fibroblast cells. [10] Cell division of NIH-3T3 is significantly increased by adding FGF-2 to the cell culture. The final product isolated by the membrane-based purification process, showed dose-dependent biological activity (see Fig. 3-6). [1]

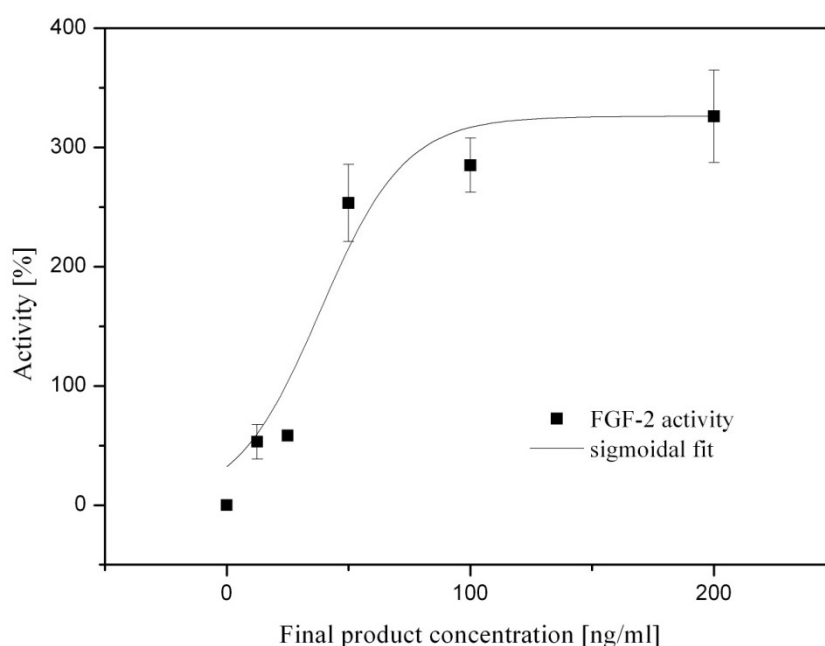


Figure 3-6: Biological activity of FGF-2 purified with the tangential flow device and analyzed by NIH-3T3 cell viability.

It can be speculated that the true bioactivity of the final product is even higher, since the analyzed fractions were of 82% purity. The LAL test showed low endotoxin content, so it can be assumed that endotoxins did not interfere with the assay. On the other hand, since basic

FGF can form complexes with the negatively charged endotoxins, a small amount of endotoxins could have remained in the purified sample. [36]

3.4 Conclusion

Within this work, we investigated two membrane adsorber devices with different flow geometries for the purification of the cytokine FGF-2. One of the tested membrane adsorbers was a commercially available device with axial flow (Sartobind[®] S75); the other was a prototype device with tangential flow which permits working with particle-containing solutions. By using the tangential flow device, we intended to integrate downstream operation steps and simplify the overall process. Our aim was to explore which device type leads to a more efficient downstream purification of the target cytokine.

Loading of the tangential device was performed in recirculation mode, which enabled higher binding capacities compared to loading in flow-through or single pass mode, but which did not allow maximum capacity utilization, as illustrated by the comparison with the axial flow, convection-driven membrane adsorbers. The target cytokine was captured in a single step and harvesting was conducted without any additional centrifugation steps. The tangential flow device was applied with both particle-free supernatant and unclarified cell lysate as starting materials. While both strategies led to purified cytokine, working with unclarified cell lysate diminished the initial binding capacity, while still providing high purity of the sample. Lower binding capacity is probably related to the decrease of ligand accessibility in the presence of cell debris. The one-step purification of basic FGF with tangential flow membrane chromatography led to a higher purity of the final sample 83%, compared to processes which employ cation exchange as the sole purification procedure [59]. Of course, the combination of cation exchange and heparin affinity chromatography enables higher purities (98-99%) compared to our study, but the simplified process succeeds in reducing complexity of the experimental setup and time consumption [10, 59].

The axial flow device can only be employed with particle-free supernatant and does not reduce the number of unit operation steps. However, the axial flow device displayed consistently higher dynamic binding capacities than the tangential flow device. Peaks obtained with the Sartobind[®] S75 exhibited higher resolution and the overall yield of FGF-2

was higher. The FGF-2 purified with both membrane adsorbers was found to exhibit very good biological activity.

In this case, the design of an economic downstream process for cytokine purification should consider whether the reduction in time and process steps can compensate for the lower yield obtained with the tangential flow device. It is likely, that the higher binding capacity of the axial flow device will be the decisive factor in establishing which process leads to a more efficient FGF-2 purification.

Acknowledgements

Original source: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elsc.201600006> Reproduced with permission

This research project was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)) within the research program cluster Biokatalyse2021.

4. Zusammenfassung

Viele Zytokine können auf Basis ihrer Wechselwirkung mit Heparin isoliert werden; ein prominentes Beispiel hierfür ist BMP-2, das in den folgenden Arbeiten als Modellprotein behandelt wird. Die Affinitätswechselwirkung mit Heparin, welches als Ligand auf den Chromatographie-Medien immobilisiert wurde, ist dabei hochspezifisch und effektiv. Leider wird das Heparin bis heute aus der Mucosa von Schweinen gewonnen, so dass es ein tierisches Produkt darstellt, was zu Zertifizierungsproblemen führt, da es so nicht als „animal component free“ bezeichnet werden kann. Daher wird dringend nach alternativen Verfahren für die ökonomische Aufreinigung von Zytokinen gesucht, die die problematische Heparin-Chromatographie ersetzen können. Ziel war die Substitution der Affinitätschromatographie durch Membranadsorber.

Alternative Aufreinigerungsverfahren zur Affinitätschromatographie basierten bisher in erster Linie auf hydrophober Interaktion und Ionenaustausch, weshalb für die Membranadsorberapplikation ein sogenannter mixed mode Membranadsorber untersucht wurde. Mithilfe spezieller Liganden wird eine hydrophobe und ionische Wechselwirkung kombiniert. Diese innovativen mixed mode Membranen ermöglichen ein alternatives Aufreinigerungsprotokoll für rhBMP-2. Idealerweise kann die Affinitätschromatographie vollständig durch Membranadsorbertechniken ersetzt werden, was den Prozess gleichzeitig von jedweden tierischen Komponenten befreit. Da rhBMP-2 als unlösliches Monomer produziert wird, aber nur als Dimer biologisch aktiv ist, müssen Solubilisierungs- und in vitro Renaturierungsschritte in den Prozess integriert werden. Nach erfolgreicher Dimerisierung kann das Protein mittels Chromatographie von Monomerrückständen, Polymeren und Wirtszellproteinen abgetrennt werden. [44]

Alternative Protokolle basieren auf hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) als Capture-Stufe in einem zweistufigen Prozess, wobei auch der zweite Schritt mittels Affinitätschromatographie realisiert wird. [48] Weitere Strategien favorisieren Ionenaustauschchromatographie [27], [40] oder Metallchelatchromatographie mittels Histidin-Tag (His-Tag) [53]. Die hohen Konzentrationen an Salzen und Detergenzien erschweren die Applikation auf Chromatographiematerialien und führen zu Verdünnungs- oder Umpufferungsschritten im Verlauf der Aufreinigung. [44, 32, 40] Jeder zusätzliche Prozessschritt resultiert in Produktverlust und verursacht zusätzliche Kosten für den Prozess. Die neuartigen Liganden der mixed mode Membranen bieten eine Erweiterung des

klassischen MA Portfolios, um zusätzliche Prozessschritte zu umgehen und Renaturierungslösungen ohne vorhergehende Konditionierung auf MA zu applizieren.

Der konventionelle Aufreinigungsprozess beginnt mit der Produktion des Monomers. Hierzu wurde eine fed batch Kultivierung mittels *E. coli* etabliert. Aufgrund des Cystinknotens wird das Protein in *E. coli* einerseits als biologisch inaktives Monomer, andererseits unlöslich in Inclusion Bodies (IBs), exprimiert. Die Produktion und Aufreinigung von rekombinantem hBMP-2 in *E. coli* ist eine etablierte Methode, um hohe Ausbeuten an rhBMP-2 IBs zu generieren. Effiziente Protokolle für die Solubilisierung und das Renaturieren aus IBs wurden erfolgreich implementiert. [44]

Die Probenaufgabe ohne vorhergehende Verdünnung oder Dialyse des rhBMP-2 Dimers ist für die industrielle Applikation unabdingbar. Aus diesem Grund werden Chromatographie-Matrizes benötigt, die auch unter Hochsalzbedingungen gute Ausbeuten liefern. Einige Protokolle bieten bereits gute Lösungen, um Verdünnungsschritte der Proteinlösung zu vermeiden. Eine vorgeschaltete HIC, die zur Reduzierung der Salzkonzentration führt oder *on-column refolding* mittels Kationenaustauscher sind einige dieser Beispiele. [40] Dennoch benötigen diese Strategien weitere Chromatographie-Schritte, um die benötigte Reinheit zu gewährleisten. Außerdem sind diese Strategien unter industriellen Aspekten komplex zu applizieren.

Mixed mode MA vereinfachen den Aufreinigungsprozess für eine direkte Isolierung aus Renaturierungs-Lösungen. Aufgrund der Ligandenkomposition sind keine Schritte zur Verdünnung, Umpufferung und Dialyse notwendig. Verschiedene Matrizes, die unter Hochsalzbedingungen arbeiten können, wurden getestet, um die optimalen Bindungsbedingungen zu generieren. Es wurde sowohl ein starker als auch schwacher mixed mode Adsorber getestet. Beide Prototypen werden aus dem identischen Vorläufermaterial hergestellt und stimmen in Porengröße und Strömungsgeometrie überein. Die Screening-Experimente zeigten eine hohe Selektivität der mixed mode Membranen für das BMP-2 Dimer unter Hochsalzbedingungen. Damit konnte eine nahezu quantitative Abtrennung von BMP-2 Monomer in einem Trennschritt erreicht werden.

Die dynamische Bindungskapazität ist ein wichtiger Parameter, um die Leistung der mixed mode Membranen für den Prozess abzuschätzen. Sie basiert auf der Modulgröße, der Flussrate, der Ligandendichte und weiteren Parametern und bestimmt am Ende die absoluten Kosten des Prozesses. Unter operativen Bedingungen bezeichnet die dynamische

Bindungskapazität (DBC) die Menge an gebundenem Protein bis zum vollständigen Durchbruch.

Die Analyse der DBCs identifiziert mixed mode schwache CEX Membranadsorber mit einer dynamischen Bindungskapazität bei 100% Auslastung von 6 mg/ml als am besten geeignet zur Isolierung von rhBMP-2 Dimer. Der MA kann ohne weitere Prozessschritte (Verdünnung, Dialyse) mit der Renaturierungslösung beladen werden. Die Trennung von rhBMP-2 Dimer durch Kombination hydrophober Interaktionschromatographie mit Kationenaustauschern führt dazu, dass das Dimer zügig von der Membran eluiert, während Monomer und Polymere bereits im Waschschrift von der Membran gelöst werden. Die Desorption wurde mit einem linearen Gradienten durchgeführt. Das Dimer eluiert bei 70% Elutionspuffer (~85 mS/cm). Die MA binden das biologisch aktive rhBMP-2 Dimer selektiv, was das Downstream Processing deutlich vereinfacht. Auch Wirtszellproteine werden erfolgreich abgetrennt.

Die Reinheit des resultierenden Zielproteins beträgt nach einem Chromatographie-Schritt über 90%. Die biologische Aktivität ist hoch. Damit ist dieser Aufreinigungsprozess mit Protokollen, die auf Säulenchromatographie beruhen, vergleichbar oder sogar überlegen. [44], [5], [37]

Hier werden erstmals mixed mode Membranen auf Kationenaustauscherbasis für eine Aufreinigungsstrategie von Zytokinen vorgestellt. Die Technologie stellt auch für weitere wertschöpfende Proteine eine interessante Alternative zu kommerziellen Chromatographiematerialien dar. Des Weiteren ist der Prozess frei von jedweden tierischen Komponenten. [19]

Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography

Gesa Gieseler¹, Iliyana Pepelanova¹, Lena Stuckenberg¹, Louis Villain², Volker Nölle³, Uwe Odenthal³, Sascha Beutel^{1*}, Ursula Rinas¹, Thomas Scheper¹

^a Institute of Technical Chemistry, Gottfried Wilhelm Leibniz University, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany

^b Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Straße 11, 37079 Göttingen, Germany

‡ Corresponding author: Tel.: +49-511-762-2868; E-mail address: beutel@iftc.uni-hannover.de

4.1 Abstract

In this study, we present the development of a process for the purification of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) using mixed-mode membrane chromatography. RhBMP-2 was produced as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *In vitro* refolding using rapid dilution was carried out according to a previously established protocol. Different membrane chromatography phases were analyzed for their ability to purify BMP-2. A membrane phase with salt-tolerant properties resulting from mixed-mode ligand chemistry was able to selectively purify BMP-2 dimer from refolding mixtures. No further purification or polishing steps were necessary and high product purity was obtained. The produced BMP-2 exhibited a biological activity of 7.4×10^5 U/mg, comparable to commercial preparations. Mixed-mode membrane chromatography can be a valuable tool for the direct purification of proteins from solutions with high-conductivity such as refolding buffers. In addition, in this particular case, it allowed us to circumvent the use of heparin-affinity chromatography, thus allowing the design of an animal-component-free process.

Keywords:

Animal-component-free, BMP-2, mixed-mode, membrane adsorbers, mixed-mode chromatography

4.2 Introduction

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) belongs to a family of proteins which are relevant in bone formation and possess powerful osteoinductive properties, with clinical significance for the treatment of fractures, as well as in the regenerative therapy of cartilage and bone [60, 61]. The mature protein is 114 amino acids long and exists as a homodimer in its bioactive form. The two monomers are orientated head-to-tail and joined together via a disulfide bond. The monomer contains three intrachain disulfide bridges, forming a structure characteristic of the BMPs, the cystine knot [63].

The clinical significance of BMP-2 has been the motivation to develop different strategies for its sourcing, including the direct extraction from bones [27, 41] or heterologous production in mammalian cell culture [64], insect cell culture [65], tobacco plants [66] or microorganisms. The recombinant production of BMP-2 in *Escherichia coli* is considered the most efficient way to obtain high yields of the protein. It has been shown that despite being non-glycosylated, the biological activity of bacterially-sourced BMP-2 is comparable to the activity of the native form produced in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell culture [27]. While it is possible to produce BMP-2 in soluble form in bacteria using fusion proteins [67], yields remain low. Therefore, most groups focus on the overproduction of the protein in *E. coli*, in form of cytoplasmic inclusion bodies [44, 68, 69]. This bears many advantages such as protection from proteolytic degradation, a high yield of relatively pure protein, as well as simpler purification. However, BMP-2 must be solubilized and refolded *in vitro* to its native structure, a dimer with cystine knots. The refolding procedure results in a mixture of the correctly folded dimer, inactive BMP-2 monomer, host cell proteins, as well as various aggregates. A major challenge is the selective isolation of the dimer and removal of monomer and aggregates. This is usually accomplished by heparin affinity chromatography

[44, 70]. While effective, this purification procedure carries the disadvantage that heparin is an animal-based material. Animal-based components in pharmaceutical bioprocessing frequently require strenuous quality control and testing for successful GMP implementation. Therefore, effective alternatives to animal-based ingredients are always of interest to process developers.

Alternative purification strategies for BMP-2 have been described in the literature. For example, Guo *et al.* performed hydrophobic interaction chromatography (HIC) in two steps for the isolation of BMP-2 [22]. Other groups have used ion-exchange chromatography [27,40] or metal chelate affinity chromatography with a His-tagged BMP-2 [71]. A disadvantage of many purification methods includes that the composition and high ionic strength of the refolding solution is incompatible with the chromatographic procedure. Therefore, the refolding solution must be diluted or buffer exchange must be performed prior to the purification process [44, 68, 40]. This additional operation step results in product losses and additional costs.

In this work, we overexpressed BMP-2 as inclusion bodies in *E. coli* and performed *in vitro* solubilization and refolding according to a protocol previously described by Vallejo and Rinas [44]. However, we used an alternative purification process, based on membrane chromatography, to capture the correctly-folded BMP-2 dimer directly from the refolding solution. We investigated a novel cationic ion-exchange (CEX) membrane phase which contains mixed-mode ligands leading to a high protein binding capability at higher conductivities in comparison to traditional CEX membranes. As a result, we could apply the refolding solution directly to the chromatographic phase. The mixed-mode membrane consists of reinforced cellulose bearing ion-exchange groups in addition to hydrophobic ligands. While the exact interaction and separation mechanism for such phases has not been fully elucidated, a double interaction mechanism is proposed, with both hydrophobic and ionic

interactions occurring to some extent [72]. Mixed mode phases for membrane chromatography have been previously described for flow-through viral clearance applications [15].

Our work illustrates a successful proof-of-concept of mixed mode membrane chromatography in a bind-and-elute application. The technique is effectively employed to isolate a valuable protein therapeutic from a high-salt refolding solution. While heparin chromatography always requires a two-to three-fold dilution of the refolding solution for processing, the CEX method described works without dilution steps. The technique can surely be adapted for the purification of alternative proteins from refolding mixtures.

4.3 Materials and Methods

Organism and growth conditions

The gene coding for hBMP-2 was synthesized as a codon-optimized sequence for *E. coli* and cloned into the expression vector pET9. The cloning procedure was verified by DNA sequencing. The expression vector pET9a-hBMP2 was then transformed into the animal-free *E. coli* strain Veggie BL21(DE3) (Merck Millipore).

Culture conditions for the production of BMP-2 with *E. coli* in a fed-batch cultivation have been described previously [23]. In brief, lysogeny broth (LB) medium (10 ml) was used for shake flask cultures. The starter culture contained 10 μ l kanamycin (50 mg/ml) and was inoculated with 1 ml of a glycerol stock and cultivated for 5 h at 37° C with agitation at 150 rpm. Afterwards, defined medium [500 ml containing 3.3 g KH_2PO_4 , 8.9 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.65 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% (w/v) glucose, 0.5 ml of kanamycin (50 mg/ml)] was inoculated with the starter culture and incubated at 37° C for 10 h at 150 rpm.

For the fed-batch process, the latter culture was transferred to a bioreactor (B. Braun Melsungen AG, Germany) containing 7 l defined medium and the process was started. Temperature was maintained at 37 °C and pH at 7.0 by 12.5% (w/v) NH₄OH. After depletion of initial glucose as indicated by a dissolved oxygen spike, the exponential addition of the feeding solution was started. A growth rate of 0.2 h⁻¹ was set (μ_{set}). After 4 h, the culture reached a relative OD₆₀₀ = 50 and 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added for a period of 4 h at 37 °C. Thereafter, cells were harvested by centrifugation and biomass was stored at -80 °C. Approximately, 70 g wet cell weight was obtained from 1 l culture.

Isolation of inclusion bodies

Protocols for solubilization and refolding procedures have been described previously [23, 24]. The frozen cell pellet was resuspended [20 g biomass in 100 ml 50 mM phosphate buffer pH 7, 4 °C] and the obtained slurry was pumped for 10 cycles at 7,000 psi through a high pressure homogenizer (Microfluidics, USA). The inclusion bodies were centrifuged for 45 min at 5,500 x g at 4 °C. The resulting pellet was washed with buffer [20 mM Tris-HCl, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2% (v/v) Triton-X100]. After vigorous stirring, the suspension was centrifuged again for 30 min at 4 °C and 26,000 x g.

Solubilization of inclusion bodies and refolding of rhBMP-2

The washed inclusion bodies were resuspended in 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA and 6 M guanidine-hydrochloride (Gnd-HCl), at a wet weight concentration of 50 mg/ml. This suspension was incubated overnight at room temperature with slow constant stirring and centrifuged later with 26,000 x g for 45 min. A total protein concentration of 10 mg/ml was determined via Bradford assay [24].

The solubilized proteins were diluted 1:100 through rapid dilution into the refolding buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 750 mM N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic

acid (CHES), 500 mM Gnd-HCl, 2 mM oxidized and 1 mM reduced glutathione (pH 8.5, sterile-filtered 0.2 μm) and were incubated for 5 days. After refolding, the solution was centrifuged for 15 min at 4,000 x g and sterile-filtered (0.2 μm).

Screening of chromatographic membranes

This study used three different types of chromatographic membrane material, which were used as membrane sheets for screening and as membrane adsorber modules for lab-scale purification. The first type was Sartobind[®] S, a commercially available strong CEX membrane with sulfonic acid ligands. The other two membranes were mixed mode prototypes, manufactured from the same precursor material. All membranes consisted of stabilized, reinforced cellulose and had pore sizes of 2-3 μm . The membrane adsorber modules used for lab-scale purification (nano units) had a bed volume of 3 ml (mixed mode strong CEX, sulfonic acid ligands) and 1.5 ml (mixed mode weak CEX, carboxylic acid ligands).

A 96-well-plate (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) containing 3 layers of membrane per well with a total surface area of 0.5 cm^2 was used for the screening of binding and eluting conditions. All purification steps (equilibration, loading, washing, eluting) can be performed using multichannel or automatic pipettes.

Transfer of the screening-scale to the lab-scale was performed using the nano modules equipped with the membrane materials described above. Binding was analyzed using gel densitometry.

Downstream processing of BMP-2

The lab-scale purification of BMP-2 was performed using a low-pressure ÄktaPure (GE Healthcare, Sweden) chromatography system with an online UV absorbance detector at 280 nm and conductivity meters. Data were recorded using the accompanying software

Unicorn (GE Healthcare, Sweden). All runs were operated at a flow rate between 1-10 ml min⁻¹.

Binding and elution conditions were adapted from the screening process. Folding additives were also used during chromatography runs in order to guarantee the stability and high recovery of the product. The loading/wash buffer was composed of 50 mM phosphate buffer (pH 4) with 500 mM Gnd-HCl, 750 mM CHES and 5 mM EDTA. The elution buffer was prepared with the same recipe as the loading/wash buffer with additional 2 M NaCl. All buffers were prepared with deionized water, degassed and filtered with 0.2 µm polypropylene filters (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany).

For the chromatographic procedure, the pH of the refolding solution was adjusted to pH 4, filtered (0.2 µm) and a 30 ml sample was loaded onto the membrane adsorber without dilution.

Regeneration of the membrane devices was performed with 10 column volumes of an 1 M NaOH solution. Samples loaded on the devices had a volume of 30 ml. Removal of Gnd-HCl and CHES after mixed mode membrane chromatography was achieved by buffer exchange with 50 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonic acid (MES, pH 5) through dialysis (MWCO: 6,000; Spectrumlabs.com, USA).

Determination of selectivity

In this experiment, a refolding mixture of BMP-2 monomer and dimer was applied to the membrane (refolding solution from day 5). Selectivity of the membranes for dimers at different pH values, expressed as ratio of BMP-2 dimer to monomer bound to the membrane, divided by ratio of BMP-2 dimer to monomer applied to the membrane as refolding solution, were calculated as follows:

$$\text{Selectivity} = \frac{\left(\frac{\text{bound BMP} - 2 \text{ dimer}}{\text{bound BMP} - 2 \text{ monomer}} \right) [\%]}{\left(\frac{\text{applied BMP} - 2 \text{ dimer}}{\text{applied BMP} - 2 \text{ monomer}} \right) [\%]}$$

Accordingly, a selectivity factor equal to 1 corresponds to a membrane which binds monomer and dimer equally under the experimental conditions. Selectivity values higher than 1 indicate higher affinity for the BMP-2 dimer.

Determination of dynamic binding capacity

Dynamic binding capacity (DBC) was determined using pure BMP-2 standard in refolding buffer at pH 4. DBC at 10% breakthrough was defined as the amount of bound protein per membrane surface area until 10% of the flow-through protein concentration of the loading solution is measured (flow-through $c/c_0=0.1$). Here c is the concentration of BMP-2 in the flow-through and c_0 is the concentration of protein in the loading solution. Accordingly, a dynamic binding capacity of 100% was defined as the BMP-2 amount when the ratio $c/c_0=1.0$ was achieved.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in a Mini Protean Tetra cell[®] (Bio-Rad, München, Germany) using 4–20% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Protein Gels, 15-well. Loading amount was 7 μ l for chromatography fractions. Gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue solution. The purified BMP-2 dimer was analyzed with and without reducing agent DTT. Destained gels were scanned on an Epson perfection V750 pro scanner.

Endotoxin assay

The endotoxin content of purified BMP-2 was determined by the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. The test was carried out using an Endosafe[®]-PTS[™] system (Charles River

Laboratories, Wilmington, USA) with a a pre-loaded cartridge comprising a detection range of 0.1-10 EU ml⁻¹ (EU = endotoxin unit), following the manufacturer's instructions.

Bioactivity assay

The biological activity of the purified BMP-2 was determined by the Alkaline Phosphatase assay (ALP assay) using C2C12 cells, according to Katagiri *et al.* [25]. The assay was calibrated with the WHO Reference Reagent for human BMP-2 (NIBSC code 93/574) provided by the National Institute for Biological Standards and Control. Briefly, serial dilutions of hBMP-2 (sample, as well as NIBSC standard) were prepared and added to the pre-cultured cells. After incubation for five days, cells were lysed and the ALP activity was measured at 405 nm using pNPP (p-nitrophenyl phosphate) as a substrate.

4.4 Results and discussion

Membrane materials screening

The development of a purification process with novel chromatography membranes is challenging, due to the need to survey a large parameter space. The aim was to find a membrane adsorber which is able to bind the BMP-2 dimer directly from the refolding solution, without prior buffer exchange or dilution. In addition, it was necessary to identify optimal conditions for BMP-2 purification in terms of selectivity and recovery. For this purpose, a screening was performed under variation of the pH of the refolding solution, whereas the conductivity remained constant. All chromatographic steps including equilibration, loading, washing and elution were carried out with the screening unit.

Fig.4-1 shows how pH variation influences the binding selectivity of the target protein on the different membranes. For this experiment, the refolding solution was applied to the screening device (containing strong mixed mode CEX, weak mixed mode CEX or Sartobind[®] S) and desorbed with elution buffer containing 2 M NaCl, in order to ensure complete recovery. It could be demonstrated that Sartobind[®] S binds the BMP-2 dimer over the complete pH range analyzed here (pH 4.0 – pH 7.5), whereas the weak and strong mixed mode CEX membranes bind BMP-2 dimer at pH 5.5 and below (Fig. 4-1A). The mixed mode membranes display enhanced binding of the dimer with decreasing pH values, outperforming Sartobind[®] S at pH 5.0 and below in terms of selectivity (Fig. 4-1B). The Sartobind[®] S membrane shows a selectivity of 1, binding monomer and dimer equally in the investigated pH range. The mixed mode membranes, in contrast, bind exclusively the dimer below pH 6, displaying selectivity values of 30 and above. This difference in affinity is probably related to the additional presence of hydrophobic moieties in the mixed mode membranes. In the case of BMP-2, these acidic binding conditions are not disadvantageous, since the calculated isoelectric point (pI) of BMP-2 is 8.4.

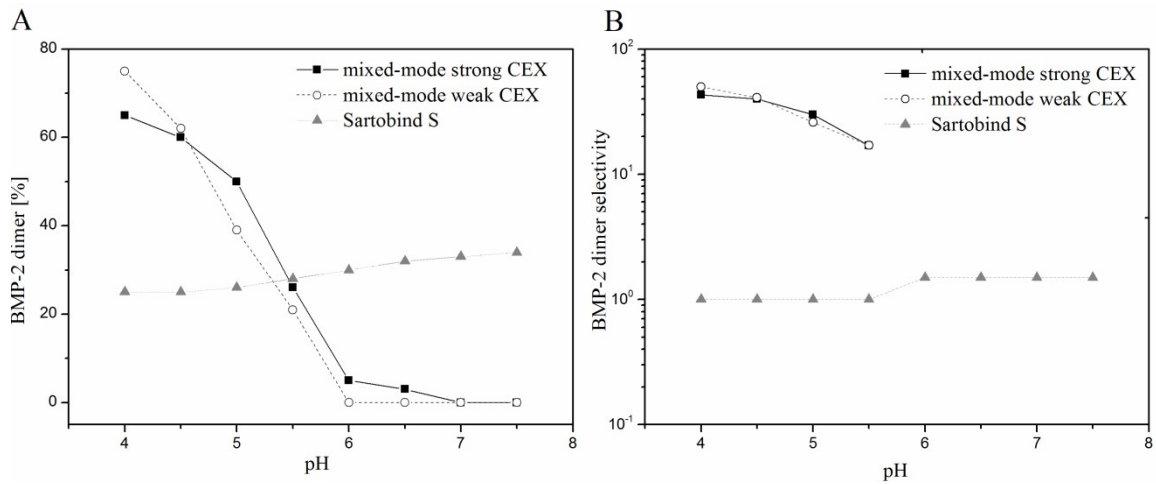


Figure 4-1: A: Effect of pH on the binding of BMP-2 dimer to the membrane materials. BMP-2 results [%] were based on the total amount of BMP-2 dimer applied to the membrane and were analyzed using gel densitometry after SDS-PAGE. The refolding solution was eluted with 2 M NaCl to ensure complete desorption. B: Selectivity of the membranes for the BMP-2 dimer at different pH values.

The different steps of the experiment: loading, washing and elution were visualized using SDS-PAGE. The gel results in Fig. 4-2 illustrate the differences between Sartobind[®] S and the mixed mode membrane adsorbers. As can also be seen from this figure, the mixed mode membranes display enhanced selectivity for the dimer. In the case of both mixed mode membranes, BMP-2 dimer is detected in the eluate, whereas the monomer is detected in the loading and wash fractions. In contrast, the conventional ion-exchange membrane recovers BMP-2 monomer and dimer equally under the given experimental conditions. The use of ionic interactions alone is not sufficient to obtain selective purification of the BMP-2 dimer from the refolding mixture. This observation has also been reported by previous experiments with cation-exchange resins [73]. The presence of hydrophobic ligands in the mixed mode membrane seems to provide selectivity for the dimer and high binding capacity at high ionic strengths.

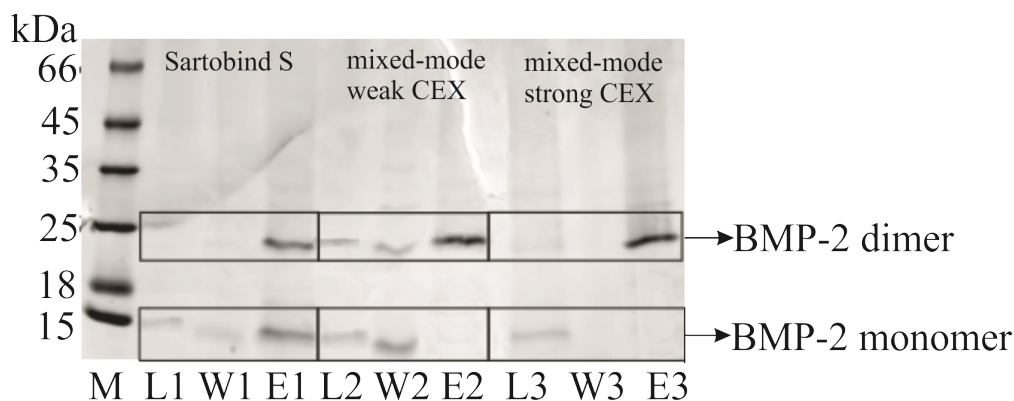


Figure 4-2: SDS-PAGE of BMP-2 refolding solutions bound and eluted from three different membranes at pH 5. M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific); L1: Loading of refolding solution on Sartobind® S, W1: Washing, E1: Elution, L2: Loading of refolding solution on weak mixed mode CEX, W2: Washing, E2: Elution, L3: Loading of refolding solution on strong mixed mode CEX, W3: Washing, E3: Elution.

Characterization of the mixed-mode membrane adsorbers

The screening experiments revealed selectivity of the mixed-mode membranes for the BMP-2 dimer, as well as high binding capacity at high ionic strengths (20 mS/cm). The next step was to characterize in detail the dynamic binding capacity (DBC) of the membrane adsorbers containing mixed mode membranes as the chromatographic phase. Protein binding capacity is a critical parameter for membrane adsorber devices. It determines the size of the module, the flow rate of the chromatography system and ultimately the total costs of purification. Under operating conditions, DBC is the amount of BMP-2 dimer which binds to the medium under given flow conditions before a significant breakthrough occurs. DBC was determined by loading pure BMP-2 (dimer) with a concentration of 1 mg/ml onto the different membrane adsorber devices. The loading of the BMP-2 sample on the membrane adsorber was monitored by UV absorption at 280 nm.

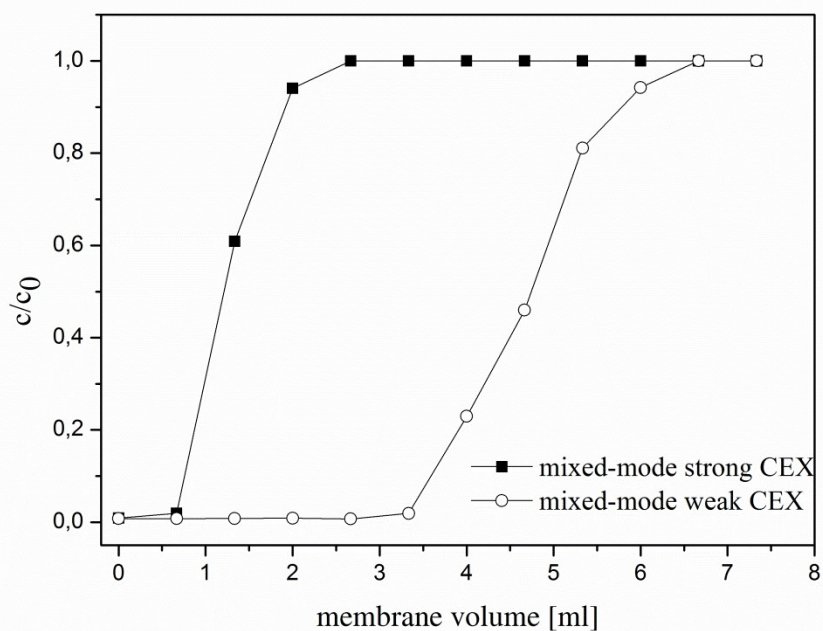


Figure 4-3: Breakthrough curves of the mixed mode weak and strong CEX membrane adsorber devices. 1 mg/ml pure BMP-2 (dimer) was loaded on the membrane with a flow rate of 3 ml/min.

Dynamic binding capacities were calculated from the breakthrough curve, as can be seen in Fig. 4-3. Comparison of the 10% and 100% dynamic binding capacities reveals that the weak CEX device using mixed mode has a higher capacity for BMP-2 than the strong mixed mode CEX membrane device (see Table 4-1). Both membrane prototypes are manufactured from the same precursor material and display identical pore size and distribution. The differences observed in DBC at pH 4 can be explained by the different degree of protonation of the respective ligands. Strong ion-exchange ligands remain negatively charged across a wide range of pH values (due to their low pKa-value). The electrostatic interactions between the strongly-charged BMP-2 protein ($\text{pH} \ll \text{pI}$) and the sulfonic acid ligands result in very strong electrostatic interactions between the ligands and the highly charged protein surface. Under this conditions multiple ligands sites may be occupied by a single BMP-2 molecule. Weak

ion-exchangers, in contrast, display a lower degree of protonation at pH <5 (pKa-value between 4-5). The associated lower electrostatic interactions result in a better utilization of the ligand density (ideally one BMP-2 protein per ligand site) and as a consequence a higher binding capacity.

Table 4-1: Comparison of 10% and 100% of dynamic binding capacities of the mixed mode

CEX membrane adsorber devices

	DB_{10%} [mg/ml]	DB_{100%} [mg/ml]
Mixed mode strong CEX	1.5	2.9
Mixed mode weak CEX	3.9	6.0

Downstream processing and purification of BMP-2

Characterization of the DBCs revealed that the weak mixed mode CEX provides a higher binding capacity for the target protein. Therefore, the weak mixed mode CEX membrane adsorber was used for further experiments. Using this membrane adsorber, we performed a capture step of BMP-2 directly from the refolding solution.

BMP-2 was prepared from inclusion bodies as described in the materials and methods section. The refolding solution was directly loaded on the membrane adsorber device. Desorption was performed with a linear gradient (see Fig. 4-4). The dimer elutes at 70% elution buffer (~85 mS/cm). The monomer was found in the wash fraction. Similar mechanisms occur during heparin affinity chromatography or ion-exchange chromatography. Here, the dimer BMP-2 form shows stronger affinity for the chromatographic phase and is eluted at higher salt concentration than the monomer [11, 26]. Interactions of the refolding mixture on the mixed mode phase resemble ion-exchange resins with the BMP-2 dimer binding with higher affinity to the membrane which allows its selective isolation. In contrast, the separation of a BMP-2 refolding mixture with hydrophobic interaction chromatography resulted in the elution of the

dimer first, since the correctly folded protein is less hydrophobic than the monomer or aggregates [15].

The eluted fractions contained highly enriched target protein (>90% purity of BMP-2 dimer, see Table 4-2) compared to crude protein amount. The isolated BMP-2 dimer was then dialyzed and tested for biological activity.

Table 4-2: Summary of BMP-2 purification with the weak mixed mode CEX membrane adsorber device.

	Volume [ml]	Protein conc.^a [mg/ml]	Amount total protein [mg]	Total amount of target protein^b[mg]	Purity of target protein [%]^b
Refolding solution	30	0.1	3.0	1.8	60
BMP-2 fractions	4.0	0.1	0.4	0.4	>90

^a protein concentration determined via Bradford assay using BSA as a standard protein

^b protein concentration determined via gel densitometry calibration curve with pure BMP-2 as a standard protein (SDS-PAGE)

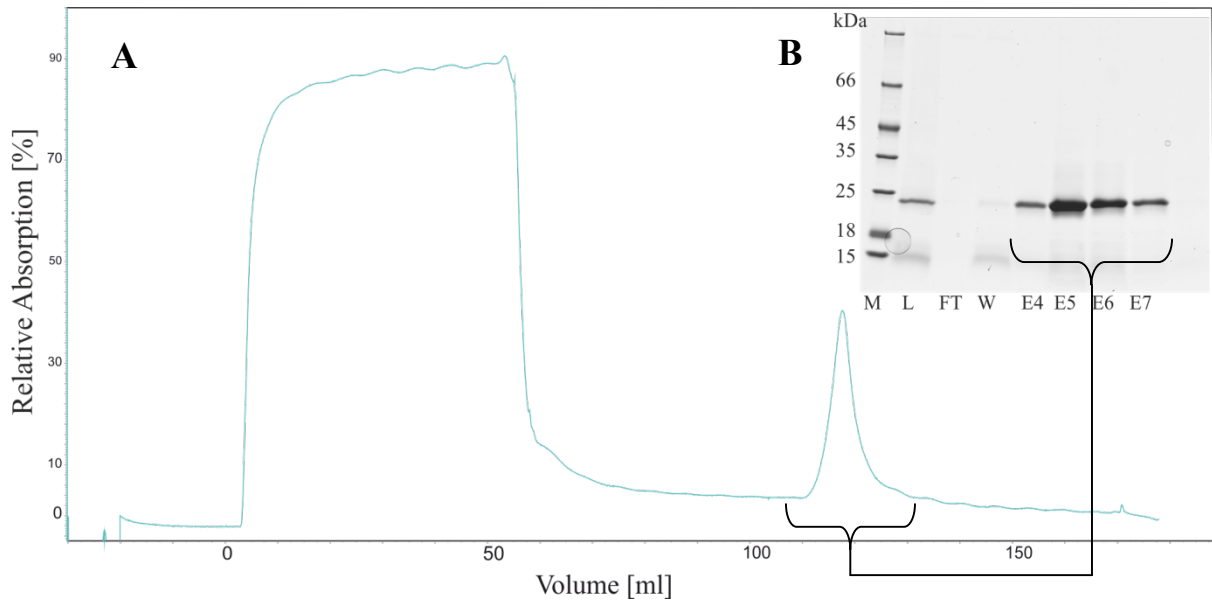


Figure 4-4: A: Chromatogram of the purification of rhBMP-2 using weak mixed mode CEX membrane chromatography. UV absorbance at 280 nm is shown. B: The resulting peak at ~ 120 ml was analyzed by Coomassie blue-stained non-reduced SDS-PAGE: M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific) L: loading of refolding sample, FT: flow-through, W: washing, E4-E7: peak fractions.

The total recovery rate of BMP-2 during the process was analyzed via gel densitometry and is presented in Fig. 4-5. The BMP-2 content was calculated for the different process stages. Final BMP-2 dimer amount was ~2%, compared to the estimated BMP-2 quantity present in fermented *E. coli* cells. Until inclusion bodies solubilization, the putative BMP-2 monomer band was used for calculation. Because formation of the dimer during refolding results in a new band at 26 kDa, this dimer band was used for recovery calculation starting from the refolding step. Samples from different process steps were visualized using SDS-PAGE (see Fig. 4-6 below).

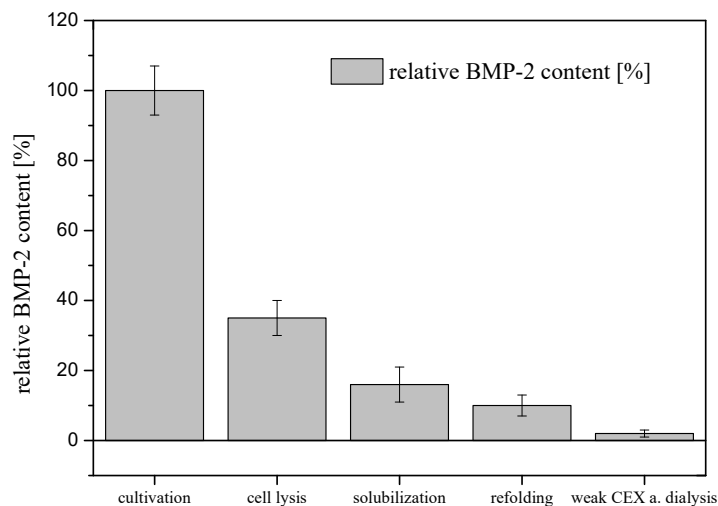


Figure 4-5: Relative content of BMP-2 monomer and dimer in the process steps estimated by gel densitometry. The relative yield of the monomer was used for calculation until formation of the dimer during refolding; afterwards the BMP-2 dimer was taken into account. The BMP-2 amount in fermented cells (“cultivation”) was set to 100%.

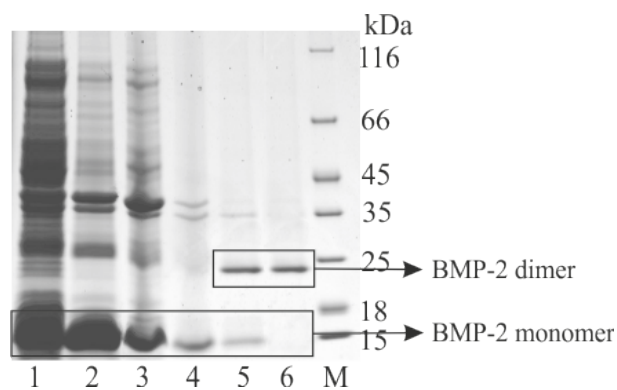


Figure 4-6: Purification of BMP-2 visualized with Coomassie brilliant blue stain on a non-reduced SDS-PAGE. 1: After cell lysis, 2: Washing step, 3: Solubilization, 4: Refolding t = starting point, 5: Refolding t = endpoint (after 5 d), 6: after weak mixed mode CEX membrane chromatography, M: Protein ladder #26610 (Thermo Scientific).

Endotoxin content

The endotoxin level is a critical parameter for cytokines used in cell culture. It was determined by the LAL assay. The measured value of 2 EU/mg is below the level of typical values of commercial suppliers (100-1,000 EU/mg).

Biological activity test

The isolated BMP-2 dimer was tested for its ability to induce alkaline phosphatase activity in C2C12 cells. This cell line differentiates rapidly, forming contractile myotubes and producing characteristic muscle proteins. Treatment with BMP-2 causes a shift in the differentiation pathway from myoblastic to osteoblastic. The measured specific biological activity was 7.4×10^5 U/mg. The assay was calibrated using the WHO Reference Reagent, NIBSC code 93/574. Commercial preparations were measured in comparison and their activity was in the range of $5-8 \times 10^5$ U/mg.

4.5 Conclusion

Production in *E. coli* is considered the method of choice for obtaining high yields of recombinant BMP-2. Efficient protocols for the refolding of solubilized inclusion bodies of the target protein have already been successfully implemented [18].

Further optimization of the process is to be found in the purification stage. A major improvement would be the direct purification of dimeric BMP-2 from the refolding mixture without prior buffer exchange or dialysis, which lead to significant product loss. This requires a chromatographic phase which displays high binding affinity for the BMP-2 dimer at high salt concentrations. Direct purification of BMP-2 dimer has been achieved by using HIC [22] or on-column refolding on a cation-exchange resin [26]. However, these procedures required additional chromatographic steps for obtaining high purity of BMP-2.

In this study we implemented a successful proof-of concept for the bind-and elute application of mixed mode membrane chromatography for rhBMP-2 purification. It could be demonstrated that membrane phases based on mixed mode can capture BMP-2 selectively from refolding solutions. The technique offers an alternative tool for the purification of therapeutic proteins possessing heparin affinity, such as BMP-2. Due to the salt-tolerant phase, the membrane tolerates higher conductivities and expands the spectrum of straightforward purification applications. In addition, the technique allowed the circumvention of heparin affinity chromatography, thus allowing the implementation of an animal-component-free manufacturing process.

Further optimization of the purification process is to be found in the buffer-exchange step, which aims the removal of additives from the final product. This procedure can result in significant product loss. Moreover, the scale-up performance of the membrane devices for rhBMP-2 purification should be characterized in order to give a final verdict on the total yield obtainable with the novel process. The present study has developed protocols for refolding-mixtures with ionic strengths of up to 20 mS/cm. An interesting aspect of further investigation would be a determination of the upper limit of salt-tolerance of the mixed mode membrane material. This will expand the range for bind-and-elute applications of mixed mode membrane chromatography in the future.

Acknowledgements

Original source: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-016-7784-1>

This research project p43 was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF) as part of the research program cluster Biokatalyse2021.

5. Zusammenfassung

Ursprünglich wurden BMPs direkt aus Knochenmatrix extrahiert, allerdings nur mit geringen Ausbeuten. [26] Später konnte biologisch aktives, rekombinantes BMP-4 mittels Säugetierzellenkulturen produziert werden. Die geringe Expressionsrate und niedrige Produkttiter sind bis heute ein Problem für die biotechnologische Produktion und Isolierung. [24, 47] Das komplexe Strukturmotiv, der Cystinknoten, führt in der Expression mit *E.coli* zur Bildung von IBs. Eine hohe Tendenz zur Proteinaggregation ist ein weiterer Grund, welcher den Herstellungsprozess komplex und damit unökonomisch macht.

Nur zwei Strategien zur rekombinanten Produktion in *E. coli* sind bekannt. Klassische Strategien benutzen einen His-Tag in der Klonierung, was nachträglich Abspaltungsvorgänge durch Enzyme notwendig macht. [35] Klösch et al. beschreiben die direkte Isolierung aus der Solubilisierung, geben jedoch keine Hinweise auf Ausbeuten und potenzielle Applikation in den industriellen Maßstab. [29]

Eine Alternative zu diesen Protokollen könnte die rekombinante Produktion von humanem BMP-4 aus IBs darstellen, die einen in vitro Refoldingschritt benötigen, um das biologisch aktive Dimer zu generieren. Die Strategien zu Produktionsmöglichkeiten dieser kostenintensiven Proteine könnte erweitert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Produktion von rhBMP-4 mittels fed batch System etabliert. Die resultierenden IBs wurden solubilisiert und renaturiert. Um die optimalen Parameter für die Rückfaltung zu erhalten, wurden Einflüsse von pH, Salzgehalt und weiteren Komponenten analysiert. Im Anschluss erfolgt die Aufreinigung mittels Membranadsorbern. In diesem Kontext wurde der Prozess mit einem herkömmlichen Kationenaustauscher realisiert.

hBMP-4 wurde rekombinant exprimiert, was zur Bildung von IBs führte. Die Solubilisierung und Renaturierung folgt. Faltungsadditive (CHAPS) und Aggregationshemmer (L-Arginin) sind zwingend notwendig für die Bildung des Dimers. Ähnliche Reagenzien, die zur erfolgreichen Dimerisierung von rhBMP-2 führten, zeigten keinen positiven Effekt für die Ausbildung der Cysteinoknoten und wurden daher im Folgenden nicht weiter untersucht.

Die Dimerisierung erfolgt abhängig vom pH-Wert, der Proteinkonzentration und der Anwesenheit von Aggregationssuppressoren. Dabei zeigt die Abhängigkeit des pH-Wert den typischen glockenförmigen Verlauf, sodass das pH-Fenster für eine erfolgreiche Renaturierung recht eng gefasst ist und zwischen pH 8-9 liegt. Aggregationssuppressoren können die Ausbeute an rhBMP-4 verdoppeln. Redoxbedingungen und Salzgehalt beeinflussen die Ausbeute an Dimer dagegen wenig. Hier konnte nur ein sehr geringer Effekt auf die Ausbeute an rhBMP-4 festgestellt werden.

Insgesamt führt die Änderung des pH-Wertes sowie eine Erhöhung des Salzgehaltes zwar zu einer verbesserten Ausbeute. Verglichen mit standardisierten Protokollen, die beispielsweise zur Dimerisierung von BMP-2 benutzt werden, ist die Gesamtausbeute an rhMBP-4 dennoch gering.

Das resultierende Produkt enthielt ungefaltetes Monomer, Dimer sowie Polymere und Wirtszellproteine. Die Separation erfolgte mittels CEX Membranchromatographie. Die Isolation des Dimers erfolgte in drei Stufen. Die Reinheit des Dimers liegt nach einem Chromatographieschritt bei ca. 80%. Nach der Aufreinigung mittels CEX Membranadsorbent wird die Identität von rhBMP-4 Dimer mittels Massenspektrometrie nachgewiesen.

Die knochen-induzierende Eigenschaft von aus *E. coli* stammenden rhBMP-4 wurde untersucht und mit aus Zellkultur stammenden, kommerziell erhältlichen rhBMP-4 verglichen. Das zurückgefaltete BMP-4 weist biologische Aktivität auf, die deutlich unterhalb der kommerziell erhältlichen Probe liegt. Ein Grund dürfte in den vorhandenen BMP-4-Aggregaten liegen. Eine Abreicherung der Aggregate würde höchstwahrscheinlich zu vergleichbaren Aktivitäten führen.

Eine fed batch Strategie zur Herstellung von rhBMP-4 wurde erfolgreich entwickelt. Die entstehenden IBs wurden mittels Solubilisierung und Renaturierungsstufen in Lösung in ihre native Form rückgefaltet und in Lösung gebracht. Eine kostengünstige Aufreinigungsstrategie mittels Membranadsorbent konnte realisiert werden. Dieses Protokoll stellt eine effektive Alternative zu den bisherigen Aufreinigungsstrategien für rhBMP-4 dar.

Solubilization and renaturation of biologically active human bone morphogenetic protein-4 from inclusion bodies

Gesa-Maria Gieseler¹, Kimia Ekramzadeh¹, Volker Nölle², Svitlana Malysheva³, Sascha Beutel¹, Ulrich Martin³, Ursula Rinas¹, Thomas Scheper¹, Iliyana Pepelanova¹

¹Institute of Technical Chemistry, Leibniz University of Hannover, Germany

²Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany

³Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Medical University Hannover, Germany

Correspondence: Dr. Iliyana Pepelanova, pepelanova@iftc.uni-hannover.de, Institute of Technical Chemistry, Gottfried Wilhelm Leibniz University, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany

Keywords

Recombinant human bone morphogenetic protein-4 (rhBMP-4), inclusion bodies, refolding, cation-exchange membrane chromatography

5.1 Abstract:

Biologically active human bone morphogenetic protein-4 (hBMP-4) was successfully produced in a prokaryotic host. For this aim, hBMP-4 cDNA was cloned in *E. coli* and the protein was produced in a non-active aggregated form. After washing and solubilization, *in vitro* refolding of the rhBMP-4 monomer was performed using rapid dilution. In this study, different refolding conditions were tested for the dimerization of rhBMP-4 by one-factor-at-a-time variation. The dimerization process was found to be sensitive to pH, protein concentration and the presence of aggregation suppressors. In contrast, redox conditions and ionic strength did not impact refolding as expected. The dimer was separated from the remaining monomer, aggregates and host cell contaminants in a single step using cation-exchange membrane chromatography. The rhBMP-4 dimer produced in *E. coli* was biologically active as demonstrated by the trophoblast differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs).

5.2 Introduction

Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) is a member of the BMP-family, a group of growth factors, initially discovered for their ability to initiate bone formation when transplanted to ectopic sites. [41] BMP-4 is part of the TGF- β superfamily and is widely expressed from early embryogenesis through adulthood. [8] It plays a key role in mesenchyme formation and the development of multiple organs. Additionally, BMP-4 also acts as a differentiation factor to hematopoietic and nerve cells and promotes epidermal commitment [13; 25, 49]. Mature BMP-4 is a homodimeric glycoprotein with a cystine knot. [30]

BMP-4 has been produced by recombinant technology, in order to study its signaling or to exploit potential therapeutic effects. Usually, production has been performed in mammalian cell lines such as NS0 and HEK293. Problems associated with this mode of production include high costs and poor yields. Therefore, some working groups have tried alternative production methods in Chinese hamster ovary cells (CHO) [75] or yeast.

Huang *et al* reported the production of codon-optimized human recombinant BMP-4 (rhBMP-4) in *Pichia pastoris*. The protein was successfully secreted in the media, but exhibited hyperglycosylation. In addition, mainly the monomer was secreted, which confirmed problems in the protein folding of the mature domain (Huang et al., 2014).

In contrast, reports of the recombinant production of rhBMP-4 in prokaryotic systems are rare. Due to its cystine knot structure, BMP-4 is produced in a non-active aggregated form in expression systems such as *E. coli*. In this case, rhBMP-4 must be solubilized and refolded *in vitro* to its native form. The refolding procedure results in a mixture of the correctly-folded dimer, inactive BMP-4 monomer, host cell proteins, as well as various aggregates. The selective isolation of the dimer and removal of monomer, aggregates and host cell impurities is required in order to obtain the isolated native product. Since BMP-4 bears a large structural and homological resemblance to BMP-2, we hypothesize that it will be possible to adapt well-described rhBMP-2 protocols [44, 45] to rhBMP-4 solubilization and refolding.

Only few protocols for the expression and purification of recombinant human BMP-4 from *E. coli* have been published so far. Bessa *et al* [35] and Klösch *et al* overexpressed rBMP-4 containing a His-tag in *E. coli*, which might require tag removal for potential clinical applications [35, 29]. In both cases, no refolding was attempted and the protein was tested for activity directly after solubilization without comparison with rhBMP-4 derived from animal cell culture.

In our study, we aim to produce rhBMP-4 without tags by using a simple refolding protocol involving rapid dilution. Due to the sequence homology between BMP-2 and BMP-4, we could start with a well-described protocol for BMP-2, which was then adapted for the refolding of BMP-4, by the addition of aggregation suppressors and optimization of parameters by performing one-factor-at-a-time-variation. After performing one-step separation of the refolding solution, we were able to isolate biologically active homodimeric rhBMP-4.

5.3 Materials and Methods

Organism and growth conditions

The gene coding for hBMP-4 was synthesized as a codon-optimized sequence for *E. coli* and cloned into the expression vector pET24a. The cloning procedure was verified by DNA sequencing. The expression vector pET24a-hBMP4 was then transformed into the *E. coli* strain BL21(DE3) (Merck Millipore, USA).

Production of BMP-4 with *E. coli* was carried out in a fed-batch cultivation. In brief, lysogeny broth (LB) medium (10 ml) was used for shake flask cultures. The starter culture contained 10 μ l kanamycin (50 mg/ml) and was inoculated with 1 ml of a glycerol stock and cultivated for 5 h at 37° C with agitation at 150 rpm. Afterwards, defined medium [500 ml containing 3.3 g KH_2PO_4 , 8.9 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.65 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% (w/v) glucose, 0.5 ml of kanamycin (50 mg/ml)] was inoculated with the starter culture and incubated at 37° C for 10 h at 150 rpm.

For the fed-batch process, the latter culture was transferred to a bioreactor (B. Braun, Germany) containing 7 l defined medium and the process was started. Temperature was maintained at 37° C and pH at 7.0 by addition of 12.5% (w/v) NH_4OH . After depletion of initial glucose as indicated by a dissolved oxygen spike, the exponential addition of the feeding solution was started. A growth rate of 0.2 h^{-1} was set (μ_{set}). After 4 h, the culture reached a relative $\text{OD}_{600} = 50$ and 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added for a period of 4 h at 37° C. Cells were harvested by centrifugation at 5,000 rpm for 25 min at 4° C and stored at -80° C. Approximately, 65 g wet cell weight was obtained from 1 l culture. The frozen cell pellet was resuspended [20 g biomass in 100 ml 50 mM phosphate buffer of pH 7 at 4° C] and the obtained slurry was pumped for 10 cycles at 7,000 psi through a high pressure homogenizer (Microfluidics, USA). The obtained cell lysate was centrifuged at 5,000 rpm for 15 min at 4° C, followed by a washing step of the pellet with a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA and 2% (v/v) Triton-X100. This step ensures removal of membrane proteins. The solution was centrifuged again at 5,000 rpm for 60 min and the pellet containing the inclusion bodies was stored at -80° C.

Solubilization of inclusion bodies and refolding of rhBMP-4

The purified inclusion bodies were incubated overnight at 4 °C in a solubilization buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT and 6 M urea. Remaining protein aggregates were separated by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant contained soluble BMP-4 at a concentration of 10 mg/ml.

The solubilized proteins were diluted 1:100 through rapid dilution into the refolding buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM EDTA, 500 mM L-arginine and 33 mM 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 2 mM oxidized glutathione and 1 mM reduced glutathione and were incubated for 4 days. After refolding, the solution was centrifuged for 15 min at 4,000 x g to remove aggregated protein and was sterile-filtered (0.2 µm). This refolding buffer represents the standard recipe in this work, which was obtained by variation of components and testing for optimal yield. Parameters were varied by the one-factor-at-a-time method. Different concentrations of CHAPS (0-50 mM) and L-arginine were tested (0-800 mM). In addition, variation of pH value, redox system and salt concentration was performed, whereas protein concentration (100 µg/ml) and incubation time (4 d) were maintained in all experiments.

Downstream processing of BMP-4 by cation-exchange membrane chromatography

The lab-scale purification of rhBMP-4 and all experiments were performed using a low-pressure ÄktaPure (GE Healthcare, Sweden) chromatography system with online UV absorbance detector at 280 nm and conductivity meters. Data were recorded using the accompanying software Unicorn (GE Healthcare, Sweden). All runs were operated at a flow rate of 1 ml/min.

Purification of rhBMP-4 was achieved by cation-exchange membrane chromatography (bed volume 3 ml, Sartobind®S nano module, Sartorius Stedim Biotech, Germany) at room temperature. Briefly, rhBMP-4 in the refolding solution was diluted 1:2 (20 mM Tris-HCl, pH 6, 8 mM urea) and applied to the column, washed with binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6, 4 M urea), and eluted using three-step-elution with the following buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6, 4 M urea, 1 M NaCl).

Removal of urea after membrane chromatography was achieved by buffer exchange with 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 in a desalting column (MWCO: 3,000; Sartorius Stedim Biotech, Germany).

Reducing and non-reducing SDS-PAGE

Protein samples were analyzed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Mini Protean Tetra cell[®] (Bio-Rad, Germany) using 4–20% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Protein Gels, 15-well. Loading amount was 7 µl for chromatography fractions. Gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue solution. The purified BMP-4 dimer was analyzed with and without reducing agent DTT and boiled for 5 min at 95 °C before loading. Destained gels were scanned on an Epson perfection V750 pro scanner. For analyzing the extent of dimerization during the refolding process, the samples were treated with iodoacetamide (final concentration 0.1 mol/l). This alkylating reagent is commonly used for blocking thiols and prevents further disulfide exchange reactions. Protein concentration and purity was determined via gel densitometry calibration curve with pure BMP-4 as a standard protein. Gel densitometry was also used to calculate the refolding yield during dimer formation. Refolding yield is expressed as percentage of dimerized rhBMP-4 dimer (after 4 d of incubation, endpoint of renaturation) compared to total rhBMP-4 concentration (starting point of renaturation).

$$\text{Refolding yield [\%]} = \frac{\text{rhBMP-4 dimer (endpoint of refolding) [\mu g]}}{\text{rhBMP-4 monomer (starting point of refolding) [\mu g]}}$$

Endotoxin assay

The endotoxin content of the purified BMP-4 was determined by the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. The test was carried out using an Endosafe[®]-PTS[™] system (Charles River Laboratories, USA) with a cartridge ranging from 0.1-10 EU ml⁻¹ (EU = endotoxin unit) and following the manufacturer's instructions.

Bioactivity assay

The biological activity of the obtained rhBMP-4 dimer was tested by the trophoblast differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). BMP-4 is known to trigger the differentiation of hiPSCs into trophoblast-like cells. [51] HiPSCs were cultured in our own in-house produced Essential 8 medium (E8). The trophoblast differentiation protocol was modified from Amita. [3] Briefly, cells were plated at low density (4 x 10³ cells per cm²) in Matrigel-coated cell culture plates in E8 medium. After 48 hours, the E8 medium was replaced with differentiation medium containing 1 µM A8301 (Tocris, UK) and 0.1 µM PD173074 (Sigma, US), as well as 10 ng/ml commercial BMP-4 (R&D Systems, USA) or the

rhBMP-4 dimer produced in *E. coli*. In 48 hours after the addition of the differentiation medium, the cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and immunostained for cdx2, a transcription factor known to be an early trophoblast marker. The primary antibody was an Anti-CDX2, clone CDX2-88 (BioGenex, US) and the secondary antibody was Alexa-Fluor-488 conjugated donkey-anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, US).

5.3 Results and discussion

Production, solubilization of inclusion bodies and *in vitro* refolding of rhBMP-4

For the recombinant protein production, a fed-batch strategy was used to achieve high cell concentrations and thereby improve productivity. BMP-4 was overexpressed in inclusion bodies. Initial refolding attempts based on BMP-2 renaturation protocols [44, 45] resulted in aggregation of the protein and did not lead to dimer formation. Alternative additives were included in the renaturation protocol which helped to solubilize the proteins and prevent precipitation. Suitable combination of such additives may result in the formation of a dimer. Commonly used additives for promoting protein refolding include amino acids (e. g. L-arginine) and detergents such as CHAPS. Rapid dilution of solubilized inclusion bodies was performed into buffers containing different concentrations of L-arginine and CHAPS. Increasing the amount of L-arginine and CHAPS enhanced the refolding yield of rhBMP-4 (see Fig. 5-1 below). Renaturation was achieved using protein concentrations between 50 and 100 µg/ml. Higher amounts of protein resulted in protein aggregation, thereby reducing the refolding yield of soluble protein. All conditions tested led to the formation of the rhBMP-4 dimer after a period of 4 days.

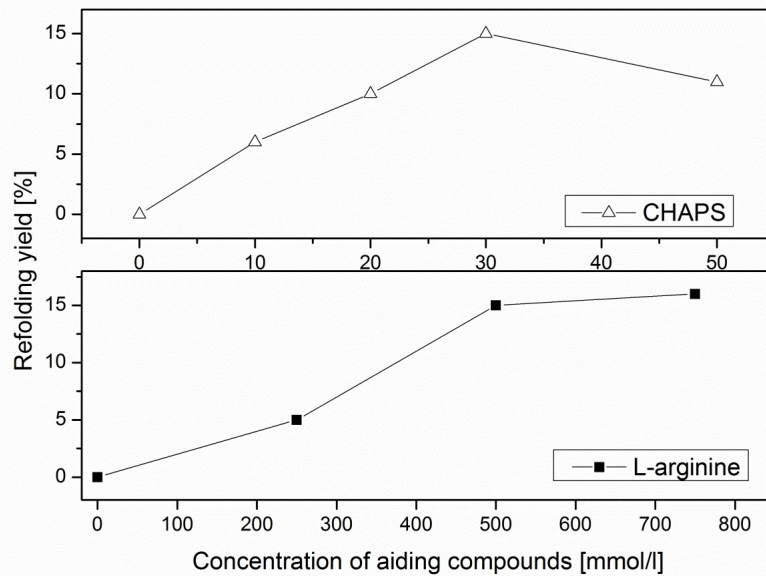


Figure 5-1: Effect of different aiding compounds on the in-vitro dimerization of rhBMP-4. Additives were adjusted to the indicated concentrations. The standard composition of refolding buffer was used for all other parameters as described in the materials and methods section.

Effect of pH, redox-conditions and salt concentration on refolding of rhBMP-4

Folding and protein association leading to aggregated proteins are competing processes which strongly depend on the pH and redox system. Disulfide bond formation and reshuffling reactions are accelerated at the highest pH where the protein can still maintain its native structure. [77] To find optimal conditions for BMP-4 refolding, different pH values were tested for renaturation (see Fig. 5-2 below), though low renaturation yields were determined at pH-values < 8. This is probably based on the fact that pH values below the pK_a value of the reactive thiolate anion ($pK_a = 8.5$) are not supporting disulfide bonding and reshuffling. At higher pH (pH > 9) renaturation yields diminish as well. This relatively narrow pH window is not unusual for proteins containing disulfide bonds. [76] Here, rhBMP-4 shows similarities to rhBMP-2, in that it exhibits only a narrow range for renaturation compared to other proteins containing cystine knots. [76]

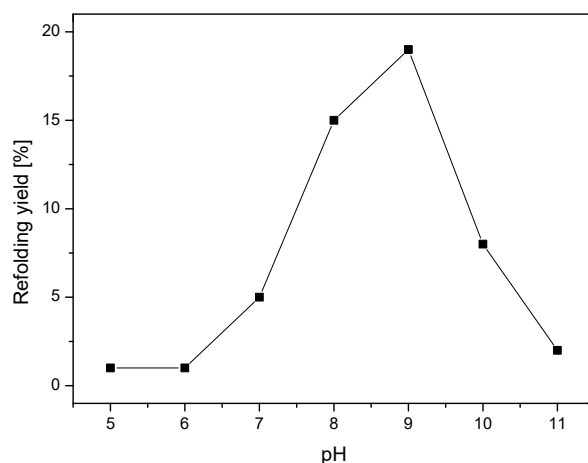


Figure 5-2: Effect of pH on the refolding yield of rhBMP-4. Here, the pH was adjusted to the indicated values. The standard composition of refolding buffer was used for all other parameters.

Mixtures of reduced and oxidized glutathione are used for the formation of the cystine knot. Usually an excess of the reduced thiol component facilitates thiol exchange and leads to higher renaturation yields. Fig. 5-3 illustrates that variation of the redox conditions results in only a minor impact on the refolding yield of rhBMP-4. The optimal conditions required two-fold excess of the oxidized glutathione but the overall yield did not improve significantly.

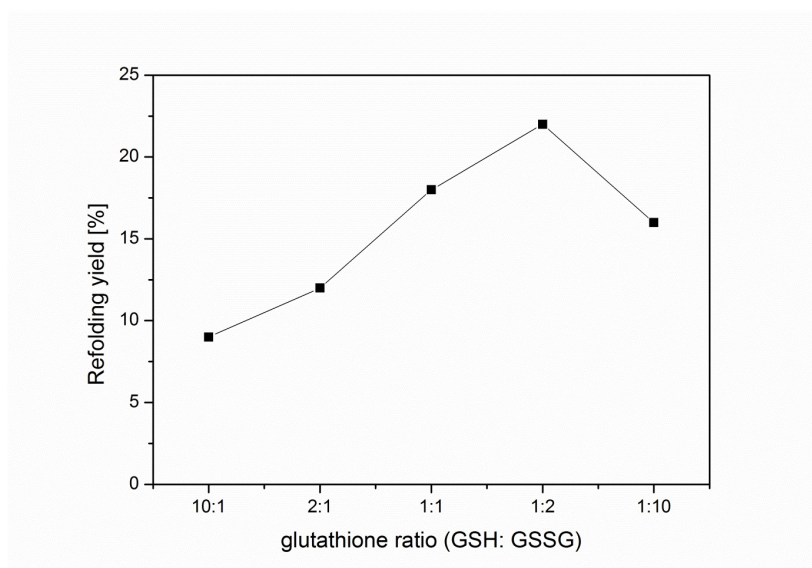


Figure 5-3: Effect of different redox systems on the refolding yield of rhBMP-4. Here, glutathione concentrations were set to the indicated ratios. Standard composition of refolding buffer was used for all other parameters.

Similar trends were determined using sodium chloride at different concentrations during the refolding process. In general, sodium chloride inhibits electrostatic interactions thereby reducing protein aggregation. High concentrations of salt have been reported to increase the refolding yield. Fig. 5-4 shows enhanced refolding yields with increasing sodium chloride concentrations. Though the overall refolding yields did not exceed 25% which indicates that sodium chloride content and redox conditions have minor impact on the refolding yield of rhBMP-4. Additionally, salt concentrations above 200 mM up to 1000 mM show no further improvement on refolding yield at all.

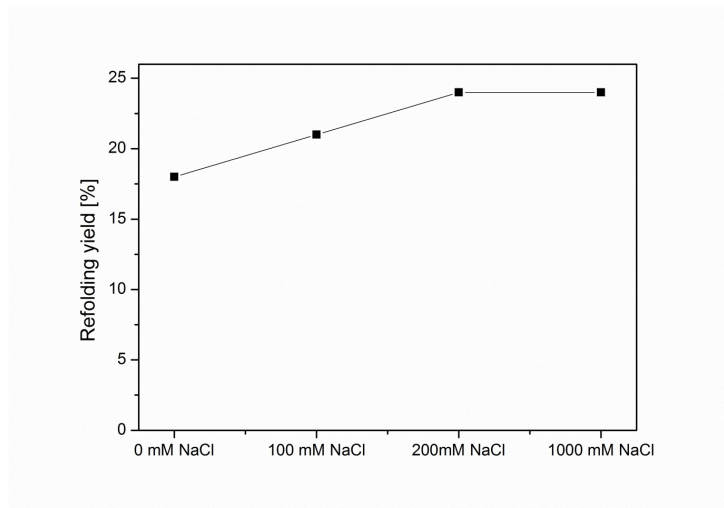


Figure 5-4: Effect of different concentrations of NaCl on the refolding yield of rhBMP-4. NaCl concentration was adjusted to the indicated values. Standard composition of refolding buffer was used for all other parameters.

Using the optimized composition of refolding buffer (as stated in the recipe in the Material and Methods section) and after an incubation time of 4 days, dimerization was completed. Figure 5-5 shows exemplarily the formation of the dimer resulting in a new band at 26 kDa. At the indicated position in lane 2, two distinct protein bands can be observed at a similar height. The upper band is a host cell protein and the lower one is BMP-4 as shown by applying a sample from the endpoint of refolding (4 days) on a reducing gel shown in lane 3. Here, the BMP-4 dimer band is reduced to its monomeric form, while the host cell protein band remains intact. The end of the refolding process results in a mixture of monomer, dimer and structures with higher molecular weight, which necessitates a separation process for the dimer form.

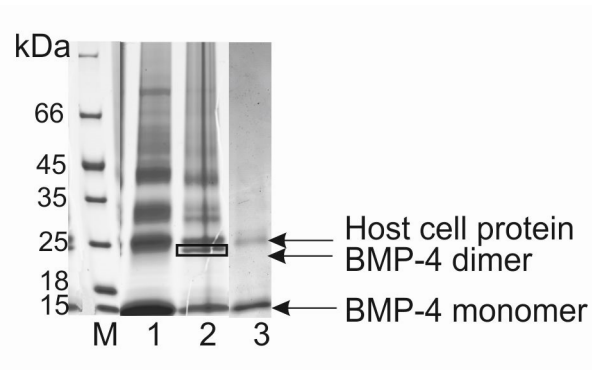


Figure 5-5: Coomassie-stained, non-reduced SDS-PAGE showing the refolding process to rhBMP-4 dimer. 1: Sample of renaturation process at t_0 , 2: Sample of renaturation after 4 days incubation time (end point), 3: End point of refolding applied on a reducing gel, M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific)

Downstream processing of BMP-4

After solubilization and renaturation, rhBMP-4 was applied to a cation-exchange membrane adsorber (Sartobind® S, Sartorius Stedim Biotech, Germany) for separation of the dimer from other components of the refolding mixture. The majority of the host cell proteins were eluted with the washing step (data not shown). Desorption was performed with three elution steps (see Fig. 5-6). The monomer was found in the first isocratic step (100 mM NaCl). The dimer eluted at 300 mM NaCl within the second isocratic step. The purified BMP-4 appeared as a single major protein band with > 80% purity on non-reduced SDS-PAGE. Aggregates and traces of BMP-4 dimer eluted within the third step (500 mM NaCl). This behavior is to be expected in ion-exchange chromatography. The BMP-4 dimer shows stronger affinity for the chromatographic phase compared to the monomer form alone. Aggregates and higher structures bind even stronger to the chromatographic membrane, which allows the selective isolation of the dimer under appropriate conditions of ionic strength. After cation-exchange membrane chromatography, the identity of resulting fractions was confirmed using mass spectrometry (data not shown). The isolated BMP-4 dimer was dialyzed and tested for biological activity.

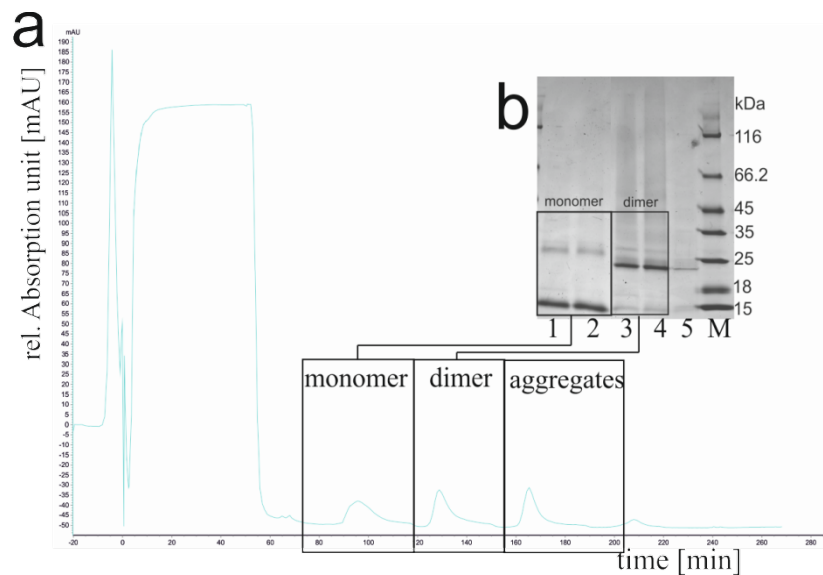


Figure 5-6: a: Chromatogram of rhBMP-4 purification using cation-exchange membrane chromatography. Three steps were used for the elution of bound proteins (containing 150 mM NaCl, 300 mM NaCl and 500 mM NaCl). UV absorbance at 280 nm is shown. Flow rate was set to 1 ml/min. b: Coomassie-stained non-reduced SDS-PAGE: 1&2: elution fraction monomer, 3&4: elution fraction dimer, 5: aggregates, M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific)

Endotoxin content and biological activity test

The endotoxin level is a critical parameter for cytokines used in cell culture. It was determined by the LAL assay. The measured value of 95 EU/mg is below the level of typical values of commercial suppliers (100-1,000 EU/mg).

Consequently, the biological activity of the purified rhBMP-4 was tested and compared to commercial rhBMP-4 (R&D Systems, USA) in the trophoblast differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Here, *cdx2* is identified as an early trophoblast marker and cells were stained for its presence. On the second differentiation day, cells with the control (rhBMP-4 from R&D Systems, 10 ng/ml) and with the rhBMP-4 dimer produced in this study (50 ng/ml), demonstrated typical cobblestone-like trophoblast morphology and expressed *cdx2* in the nuclei. The rhBMP-4 dimer from *E. coli* did not display biological activity at a concentration of 10 ng/ml (data not shown). Without the addition of BMP-4 (negative control), the cells failed to form a cobblestone-like monolayer and did not express *cdx2* (Fig. 5-7).

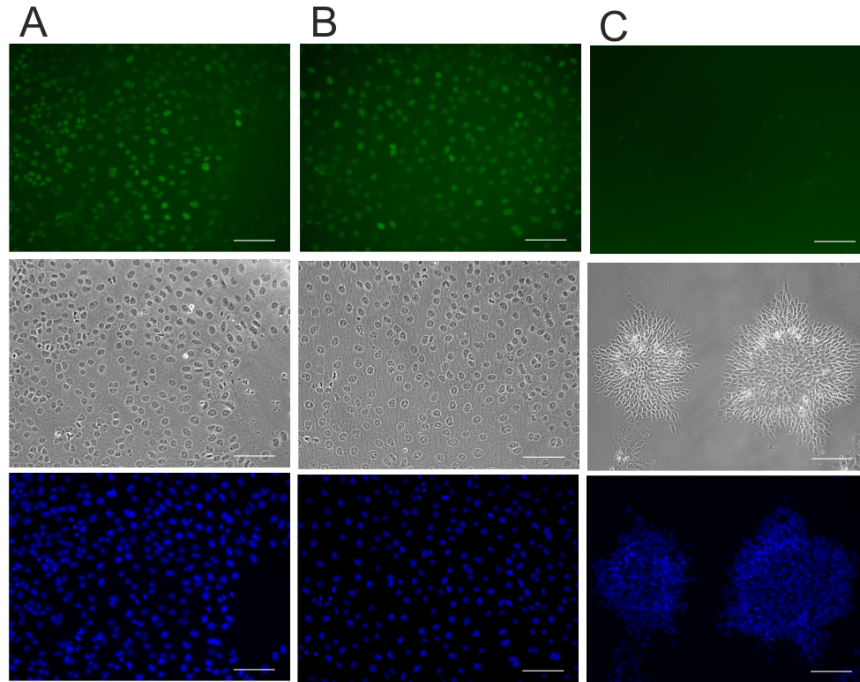


Figure 5-7: HiPSCs after 48 hours in differentiation medium with A: *E. coli*-produced rhBMP-4 (conc. 50 ng/ml), B: commercial rhBMP-4 (conc. 10 ng/ml) or C: without BMP-4 addition (negative control). Cdx-2 positive cells were stained green (upper row), cells with rhBMP-4 demonstrated typical cobblestone morphology on the second day of differentiation (middle row), cell nuclear counter staining with DAPI (last row), scale-bar 100 μm .

5.5 Conclusion

In this contribution, a new strategy suitable for the large-scale production and purification of recombinant human BMP-4 is shown. BMP-4 was overexpressed in *E. coli* in the form of inclusion bodies. The purified inclusion bodies were solubilized and different compositions of refolding buffers were tested for the achievement of optimal renaturation yield. The final product of refolding included a mixture of dimer, monomer and higher aggregates. Thus, purification was necessary to isolate the dimer from the refolding mixture selectively, in order to test for biological activity. Separation of the refolding mixture was performed by a single purification step involving cation-exchange membrane chromatography using step elution. The biological activity of the *E. coli*-derived rhBMP-4 was examined by its ability to induce the transcription factor *cdx-2*, an early marker of trophoblast differentiation, and compared to rhBMP-4 derived from NS0 culture. Qualitative analysis indicated that rhBMP-4 from *E. coli* is biologically active; however its activity was significantly lower than cell culture-derived rhBMP-4. The reason for reduced bioactivity in the bacterial rhBMP-4 could very well be the lack of glycosylation patterns, as previously shown *in vitro* for rhBMP-2 produced in prokaryotic systems (van de Watering et al., 2012). In addition, the smears visible in the gel after purification in Figure 4-6b indicate that some BMP-4 aggregates are still present in the sample. These surely diminish the bioactivity of the sample. Nevertheless, the process for rhBMP-4 production presented here demonstrates that it is feasible to produce biologically active rhBMP-4 dimer from *E. coli*. The process is marked by simplicity and can be easily up-scaled through the use of a larger membrane module.

Acknowledgements

Original source: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5989590/>

This research project P43 was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF) as part of the research program cluster Biokatalyse2021.

6 Diskussion und Ausblick

Membranadsorber besitzen Eigenschaften, die komplexe Aufreinigungen vereinfachen können. Dadurch werden Prozessschritte übersprungen und Produkttiter erhöht. Die Applikation vom Laborversuch in den industriellen Maßstab verläuft linear. Es wurden drei Modellzytokine vorgestellt, die durch ihre komplexen Struktur motive individuelle Aufreinigungsprozesse benötigen.

Bewertung der Strömungskonfiguration von Membranadsorber zur Aufreinigung wertvoller biotechnologischer Produkte:

Im ersten Abschnitt wurde der Einfluss unterschiedlicher Strömungskonfiguration von Membranadsorbern auf die Aufreinigung verglichen. Sogenannte direct capture Module besitzen ein tangenciales Strömungsverhalten und durch den Einsatz von Spacern eine veränderte Strömungskonfiguration im Vergleich zu klassischen axial durchströmten Membranadsorbern. Direct capture Membranadsorber ermöglichen damit eine direkte Aufreinigung aus Partikel-haltigen Lösungen. Intrazellulär produziertes FGF-2 diene als Modellprotein. In dieser Prozesskette kann der notwendige Separationsschritt mittels Zentrifugation oder Filtration übersprungen und direkt die Membranchromatographie durchgeführt werden. Tangential durchströmte Membranadsorber zeigen zwar geringerer Bindungskapazitäten unter operativen Bedingungen, vereinfachen aber die Prozesskette und ermöglichen verstärkt Anwendungen die rezirkulativ betrieben werden.

Mixed mode Membranchromatographie für die Aufreinigung von BMP-2:

BMP-2 wird durch sein komplexes Strukturmotiv ausschließlich in IBs gebildet. Die Aufreinigung umfasst neben dem Zellaufschluss auch Solubilisierungs und Renaturierungsschritte. Die Proteinlösung wird anschließend auf die Membranen oder Säulen appliziert.

Es werden jedoch Verdünnungsschritte oder Umpufferungsschritte benötigt, um trotz hoher Konzentrationen an Faltungsgadditiven und NaCl eine Interaktion der Analyten mit der Matrix zu gewährleisten.

Mixed mode Membranen können bei dieser Problemstellung eine Schlüsselrolle in der Aufreinigung einnehmen. Dank ihrer Kombination aus hydrophoben Liganden und Ionenaustauschern erweitern sie das Portfolio klassischer Membranadsorber und eliminieren

Umpufferung und Verdünnungsschritte. Hier konnte die Aufreinigung von rhBMP-2 erfolgreich auf mixed mode Membranadsorber appliziert werden. Die Trennung von Monomer und Dimer ist ohne Affinitätschromatographie möglich. Zusätzlich ist der Prozess im Vergleich zu bisherigen Strategien frei von jedweden tierischen Komponenten und ist damit unter ökonomischen Gesichtspunkten eine echte Alternative zu bisherigen Aufreinigungsstrategien.

Produktion und Aufreinigung von rhBMP-4 mittels Membranchromatographie

Für die rekombinante Produktion und Isolation von BMP-4 gibt es bis heute nur wenige publizierte Strategien. BMP-4 zeigt, trotz sequentieller Ähnlichkeit zu BMP-2, andere Eigenschaften bzgl. Rückfaltung und Produktausbeute. Hierzu wurden Refoldingprozesse durchgeführt, bei denen jeweils ein Faktor pro Experiment verändert wurde und alle anderen Parameter konstant bleiben. Faltungsadditive, die bei rhBMP-2 den Renaturierungsprozess katalysierten, führen bei rhBMP-4 nicht zur Bildung des gewünschten Dimers. Dementsprechend muss zunächst ein umfangreiches Screening potenzieller Additive durchgeführt werden, die die Rückfaltung von rhBMP-4 Monomer zum nativen rhBMP-4 Dimer ermöglichen. Die Art des Redoxsystems und der Gehalt an NaCl zeigten nur geringe Auswirkungen auf die Refoldingausbeute. Das Downstream Processing kann mit klassischen Membranadsorber etabliert werden. Bereits die Separation von Monomer und Dimer mittels CEX Membranchromatographie ist anspruchsvoll, da die proteinchemischen Eigenschaften ähnlich und schwer voneinander zu trennen sein können. Durch die unvollständige Dimerisierung von BMP-4 müssen zusätzlich Polymere isoliert werden. Die Komplexität des Downstream Processing ist hoch. Trotzdem kann rhBMP-4 mit guter Reinheit von der Membran eluiert werden.

Ausblick:

Die Modellzytokine wurden ausschließlich im Labormaßstab produziert und isoliert. Insbesondere die Applikation in den industriellen Maßstab wäre mit allen Modulen durchführbar und bietet weitere Fragestellungen, um Downstream Processing langfristig kostengünstiger zu gestalten.

Neuartige mixed mode Module können die Aufreinigung von vielen anderen Proteinen revolutionieren, insbesondere um Proteine aus IBs zu generieren. Bereits für rhBMP-4 könnte die Aufreinigung durch mixed mode Modulen eine interessante Alternative darstellen, um

Produktausbeuten zu erhöhen. Die Membranadsorber-Technologie stellt eine hochwertige Alternative zu konventionellen chromatographischen Verfahren dar. Spezielle Modulkonfigurationen, wie partikelgängige oder mixed mode Adsorber ermöglichen weiterführende Trennansätze hinsichtlich der Einsparung von unit operations oder der simultanen Nutzung mehrerer Trennwechselwirkungen.

Auch ist die geringere Bioaktivität von rekombinant produziertem BMP-4 im Vergleich zu aus der Zellkultur stammendem BMP-4 nicht vollständig geklärt. Die Aufklärung, ob dies chargen-abhängig oder systematisch der Fall ist, steht bisher noch aus.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Alexander, D. J. Browse, S. J. Reading, and I. S. Benjamin. *A simple and accurate mathematical method for calculation of the ec50*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 41(2-3):55-58, 1999.
- [2] E. Alvarez, C. Cahoreau, and Y. Combarnous. *Comparative structure analyses of cystine knot-containing molecules with eight aminoacyl ring including glycoprotein hormones (gph) alpha and beta subunits and gph-related a2 (gpa2) and b5 (gpb5) molecules*. Reproductive biology and endocrinology: RB&E, 7, 2009.
- [3] M. Amita, K. Adachi, A. P. Alexenko, S. Sinha, D. J. Schust, L. C. Schulz, R. M. Roberts, and T. Ezashi. *Complete and unidirectional conversion of human embryonic stem cells to trophoblast by bmp4*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(13), 2013.
- [4] G. Antranikian, editor. *Angewandte Mikrobiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [5] Anuja M. Rane, Sriramakamal Jonnalagadda, and Zhiyu Li. *On-column refolding of bone morphogenetic protein-2 using cation exchange resin*. Protein Expression and Purification, 90(2), 2013.
- [6] A. Bikfalvi, S. Klein, G. Pintucci, and D. B. Rifkin. *Biological roles of fibroblast growth factor-2*. Endocrine reviews, 18(1), 1997.
- [7] C. P. Bramlage, T. H. Hüpl, C. Kaps, P. Bramlage, G.-A. Müller, and F. Strutz. *Bone morphogenetic proteins in the skeletal system*. Zeitschrift für Rheumatologie, 64(6):416-422.
- [8] D. W. Burt and A. S. Law. *Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily*. Progress in growth factor research, 5(1):99-109, 1994.
- [9] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72(9), 1975.
- [10] R. Chen, J. John, A. Lavrentieva, S. Müller, M. Tomala, Y. Zhao, R. Zweigerdt, S. Beutel, B. Hitzmann, C. Kasper, U. Martin, U. Rinas, F. Stahl, and T. Scheper. *Cytokine production using membrane adsorbers: Human basic fibroblast growth factor produced by escherichia coli*. Engineering in Life Sciences, 12(1), 2012.

- [11] C. Scheuer, Walter Sebald, and Martin Hülsmeier. *Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 resolution*. Journal of Molecular Biology, 287(1), 1999.
- [12] P. Cutler. *Protein purification protocols*, 244 of Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, N.J, 2nd ed. edition, 2004.
- [13] L. Dale, G. Howes, B. M. Price, and J. C. Smith. *Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early xenopus development*. Development (Cambridge, England), 115(2): 1992.
- [14] P. Ducy and G. Karsenty. *The family of bone morphogenetic proteins*. Kidney international, 57(6), 2000.
- [15] S. Fischer-Frühholz. *Membranadsorber: Chromatographische Aufreinigung in neuen Dimensionen*. GIT Laborfachzeitschrift, (06):603{605, 2004.
- [16] S. Fischer-Frühholz, R. Faber, H.-H. Hörl, W. Demmer, and M. Hirai. *Neuartige hic- und aex-membranadsorber*. Chemie Ingenieur Technik, 81(8):1289{1290, 2009.
- [17] S. Fischer-Frühholz, D. Zhou, and M. Hirai. *Sartobind stic salt-tolerant membrane chromatography*. Nat Meth, 7(12), 2010.
- [18] F.Sellke, Roger J Laham, Elazer R Edelman, Justin D Pearlman, and Michael Simons. *Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: Technique and early results*. The Annals of Thoracic Surgery, 65(6):1540-1544, 1998.
- [19] G. Gieseler, I. Pepelanova, S. Beutel, U. Rinas, T. Scheper, L. Villain, and V. Nölle. *Purification of bmp-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography*. Chemie Ingenieur Technik, 88(9):1397, 2016.
- [20] G. Gieseler, I. Pepelanova, A. Meyer, L. Villain, S. Beutel, U. Rinas, and T. Scheper. *Considerations on the ow configuration of membrane chromatography devices for the purification of human basic fibroblast growth factor from crude lysates*. Engineering in Life Sciences, 16(8):697-705, 2016.
- [21] D. Harkensee, O. Kökpınar, J. Walter, C. Kasper, S. Beutel, O.-W. Reif, T. Scheper, and R. Ulber. *Fast screening for the purification of proteins using membrane adsorber technology*. Engineering in Life Sciences, 7(4):388-394, 2007.
- [22] F. Horn. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme, Stuttgart, 3., grundlegend überarb. und erw. au. edition, 2005.
- [23] U. Horn, W. Strittmatter, A. Krebber, U. Knüpfer, M. Kujau, R. Wenderoth, K. Müller, S. Matzku, A. Plückthun, and D. Riesenberger. *High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in escherichia coli, using an optimized expression*

- vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5).
- [24] D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, R. J. Kaufman, V. Rosen, K. A. Cox, and J. M. Wozney. *Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo*. *Growth factors* (Chur, Switzerland), **13**(3-4), 1996.
- [25] C. M. Jones, K. M. Lyons, and B. L. Hogan. *Involvement of bone morphogenetic protein-4 (bmp-4) and vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse*. *Development* (Cambridge, England), 111(2):531, 1991.
- [26] K. Bessho, K. Kusumoto, K. Fujimura, Y. Konishi, Y. Ogawa, Y. Tani, and T. Iizuka. *Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein*. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(1), 1999.
- [27] K. Bessho, Y. Konishi, S. Kaihara, K. Fujimura, Y. Okubo, and T. Iizuka. *Bone induction by escherichia coli -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(6), 2000.
- [28] T. Katagiri, A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, and T. Suda. *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of c2c12 myoblasts into the osteoblast lineage*. *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 1), 1994.
- [29] B. Klösch, W. Fürst, R. Kneidinger, M. Schuller, B. Rupp, A. Banerjee, and H. Redl. *Expression and purification of biologically active rat bone morphogenetic protein-4 produced as inclusion bodies in recombinant escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 27(20), 2005.
- [30] L. Leong and Paul M. Brickell. *Bone morphogenetic protein-4*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(12):1293-1296, 1996.
- [31] S. J. Lin, T. F. Lerch, R. W. Cook, T. S. Jardetzky, and T. K. Woodruff. *The structural basis of tgf-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding*. *Reproduction* (Cambridge, England), 132(2):179-190, 2006.
- [32] S. Long, L. Truong, K. Bennett, A. Phillips, F. Wong-Staal, and H. Ma. *Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 46(2):374-378, 2006.
- [33] H. Loppnow. *Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen*. *Der Internist*, 42(1):13-27, 2001.

- [34] C. Müller and U. Rinas. *Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant escherichia coli using size-exclusion chromatography*. Journal of chromatography. A, 855(1):203-213, 1999.
- [35] P.C. Bessa, M.T. Cerqueira, T. Rada, M.E. Gomes, N.M. Neves, A. Nobre, R.L. Reis, and M. Casal. *Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human bmp-4, -9, -10, -11 and -14*. Protein Expression and Purification, 63(2):89-94, 2009.
- [36] D. Petsch and F. B. Anspach. *Endotoxin removal from protein solutions*. Journal of Biotechnology, 76(2-3):97-119, 2000.
- [37] H. T. Pramesti, T. Suciati, A. Indrayati, S. Asjarie, and D. S. Retnoningr. *Recombinant human bone morphogenetic protein-2: Optimization of overproduction, solubilization, renaturation and its characterization*. Biotechnology(Faisalabad), 11(3):133-143, 2012.
- [38] R. Ghosh. *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*. Journal of Chromatography A, 952(1 {2}):13-27, 2002.
- [39] T. Schöneberg. Endo- und parakrine regulation der gonadenfunktion. In D. Ganten, K. Ruckpaul, and J. Köhrle, editors, *Molekularmedizinische Grundlagen von para und autokrinen Regulationsstörungen . der Gonadenfunktion n,p*. 581-605. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [40] N. E. Sharapova, A. P. Kotnova, A. E., A. S. Semikhin, A. V. Gromov, L. A. Soboleva, A. S. Ershova, V. V. Zaitsev, O. V. Sergienko, V. G. Lunin, and A. S. Karyagina. *Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in escherichia coli and testing of its biological activity in vitro and in vivo*. Molecular Biology, 44(6):923-930, 2010.
- [41] Thomas Mueller and Joachim Nickel. *Promiscuity and specificity in 5bmp6 receptor activation*. 5FEBS6 Letters, 586(14):1846-1859, 2012.
- [42] M. R. Urist, A. Mikulski, and A. Lietze. *Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(4):1828-1832, 1979.
- [43] M. R. Urist and B. S. Strates. *Bone morphogenetic protein*. Journal of Dental Research, 50(6):1392-1406, 1971.
- [44] L. F. Vallejo, M. Brokelmann, S. Marten, S. Trappe, J. Cabrera-Crespo, A. Hoffmann, G. Gross, H. A. Weich, and U. Rinas. *Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 94(2):185-194, 2002.

- [45] L. F. Vallejo and U. Rinas. *Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration*. Biotechnology and bioengineering, **85**(6):601-609, 2004.
- [46] J. Vilcek and M. Feldmann. Historical review: *Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics*. Trends in pharmacological sciences, **25**(4):201 {209, 2004.
- [47] E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, and P. LaPan. *Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **87**(6):2220 {2224, 1990.
- [48] Wangming Guo, Xiangcheng Zhu, Jin Cai, Lei Huang, Peilin Cen, and Zhinan Xu. *Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from escherichia coli*. Process Biochemistry, **47**(6):960-967, 2012.
- [49] G. Winnier, M. Blessing, P. A. Labosky, and B. L. Hogan. *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. Genes & development, **9**(17):2105-2116, 1995.
- [50] J. Wozney, V. Rosen, A. Celeste, L. Mitsock, M. Whitters, R. Kriz, R. Hewick, and E. Wang. *Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities*. Science, **242**(4885):1528-1534, 1988.
- [51] R.-H. Xu, X. Chen, D. S. Li, R. Li, G. C. Addicks, C. Glennon, T. P. Zwaka, and J. A. Thomson. *Bmp4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast*. Nature biotechnology, **20**(12):1261 {1264, 2002.
- [52] H. Yamaguchi and M. Miyazaki. *Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies*. Biomolecules, **4**(1):235 {251, 2014.
- [53] Yanhong Zhang, Yinsun Ma, Mingying Yang, Sijia Min, Juming Yao, and Liangjun Zhu. *Expression, purification, and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro*. Protein Expression and Purification, **75**(2):155 {160, 2011.
- [54] Orr, V.; Zhong, L.; Moo-Young, M.; Chou, C.P. *Recent advances in bioprocessing: Application of membrane chromatography*. Biotechnology Advances: **31**; 450-465, 2013.

- [55] Kreuß, M. Kulozik, U. *Separation of glycosylated caseinomacropeptide at pilot scale using membrane adsorption in direct-capture mode*, Journal of chromatography, **1216**(50),8771-8777, 2009.
- [56] Schoenbeck, I, Graf AM., Leuthold, M., Pastor, A., Beutel, S. *Purification of high value proteins from particle containing potato fruit juice via direct capture membrane adsorption chromatography*, Journal of Biotechnology, **168**(4) 693-700, 2013.
- [57] Hofmann 2004
- [58] Knoerzer, W, Binder H-P., Schneider, K., Gruss, P, McCarthy J.,Risau W. *Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factors (bFGFs) in Escherichia coli* Gene **75**,21-30 Elsevier, 1989
- [59] Seeger
- [60] Lissenberg-Thunnissen, S.N., et al., *Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing*. International Orthopaedics, 2011. **35**(9): p. 1271-1280.
- [61]. Termaat, M.F., et al., *Bone Morphogenetic Proteins. Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects*, 2005. **87**(6): p. 1367-1378.
- [63] Carreira, A.C., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **561**: p. 64-73.
- [64]. Israel, D.I., et al., *Expression and Characterization of Bone Morphogenetic Protein-2 in Chinese Hamster Ovary Cells*. Growth Factors, 1992. **7**(2): p. 139-150.
- [65] Maruoka, Y., et al., *Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system*. Biochemistry and Molecular Biology International, 1995. **35**(5): p. 957-963.
- [66] Gao, Y., et al., *Expression of Human BMP-2 Gene in Different Tissues of Tobacco Plants*. Acta Genetica Sinica, 2006. **33**(1): p. 56-62.
- [67] Ihm, H.J., et al., *Soluble expression and purification of synthetic human bone morphogenetic protein-2 in Escherichia coli*. BMB Rep, 2008. **41**(5): p. 404-7.
- [68] Long, S., et al., *Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2006. **46**(2): p. 374-378.
- [69] von Einem, S., E. Schwarz, and R. Rudolph, *A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2*. Protein Expr Purif, 2010. **73**(1): p. 65-9.

- [70] Ruppert, R., E. Hoffmann, and W. Sebald, *Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity*. European Journal of Biochemistry, 1996. **237**(1): p. 295-302.
- [71] Guo, W., et al., *Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli*. Process Biochemistry, 2012. **47**(6): p. 960-967.
- [72] Yoshimoto, N., et al., *Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations*. Biotechnology Journal, 2015. **10**(12): p. 1929-1934.
- [73] Rane, A.M., S. Jonnalagadda, and Z. Li, *On-column refolding of bone morphogenetic protein-2 using cation exchange resin*. Protein expression and purification, 2013. **90**(2): p. 135-140.
- [74] Huang, Y., Zhen, B., Lin, Y., Cai, Y., Lin, Z., Deng, C., Zhang, Y., (2014) *Expression of codon optimized human bone morphogenetic protein 4 in Pichia pastoris*. Biotechnology and applied biochemistry **61**, 175-183.
- [75] Kim, C.L., Bang, Y.L., Kim, Y.S., Jang, J.W., Lee, G.M., *Alleviation of proteolytic degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-4 by repeated batch culture of Chinese hamster ovary cells*. Process Biochemistry **51**, 1078-1084, 2016.
- [76] Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., Rudolph, R., *The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies*. European Journal of Biochemistry **268**, 3296-3303, 2001.
- [77] Rudolph, R., Bähm, G., Lilie, H., Jaenicke, R., *Folding proteins*. Protein function: A practical approach 2, 57-99, 1997.

Verzeichnisse

Tabelle 2-1: Charakteristische Eigenschaften der Zytokine und Abgrenzung zu Hormone [33].	13
Abbildung 2-1 Schematische Darstellung eines Prä-Proteins. Die Cysteine sind schwarz gestrichelt dargestellt.....	18
Tabelle 2-1 Übersicht der funktionellen Liganden für Ionenaustauschermembranen. [15].....	23
Abbildung 2-2 Herstellung und Produktion der Membranmodule. Beispiel für eine tangentielle Überströmung der Membran zur Adsorption aus partikel-haltigen Medien. [20]	24
Abbildung 2-3 Strömungsrichtung eines klassischen Membranadsorbers (axiale Strömungsrichtung). [20]	24
Figure 3-1 The purification process of FGF-2 from the soluble lysate using two different membrane chromatography devices.....	33
Figure 3-2: Experimental setup for FGF-2 purification with the membrane chromatography devices on the ÄktaPure liquid chromatography system. The solid line represents conventional chromatography steps (single pass mode, flow-through), while the dotted line represents recirculation loading mode.....	35
Figure 3-3: Dynamic breakthrough curves using 2 mg/ml FGF-2 to nearly 100% breakthrough at different flow rates. c/c_0 is the relative FGF-2 concentration measured via UV absorbance at 280 nm. Comparison of the direct capture tangential flow device against the axial flow device in single pass mode. FGF-2 solution was centrifuged and filtered before loading. A: DBCs of the axial flow device with different flow rates 1/5/10 ml/min. B: DBCs of tangential flow device with different flow rates 1/5/10 ml/min .C: Comparison of axial flow device with tangential flow device.....	39
Figure 3-4: A: Purification of intracellular FGF-2 using the tangential flow membrane device. UV absorbance is indicated by the blue and red line, monitoring direct capture membrane performance with unclarified cell lysate (blue) and particle-free supernatant (red), respectively. B: Zoomed elution profile with unclarified cell lysate (blue line). The cell lysate	

contained ca. 5 mg ml⁻¹ FGF-2 solution and was loaded on the membrane at flow rates of 10 ml/min. The blue line monitors UV absorption. Retention time of FGF-2: 60 min (at 60% elution buffer). SDS-PAGE: Process overview of different steps during FGF-2 purification; M: protein ladder (prestained protein ladder, Thermo Scientific); 1: breakthrough t = 0 min (dilution 1:2); 2: breakthrough t = 20 min (dilution 1:2); 3: Washing; 4: Elution fraction 3F; 5: Elution fraction 14F (single fraction FGF-2); 6: Elution fraction 9E; 7: Elution fraction 2F-7E; 8: Elution fraction 13F-15E (total FGF-2 peak)..... 41

Table 3-1 A: Summary of FGF-2 purification with particle-free supernatant and the tangential flow device; loading was performed in recirculation mode (see Fig. 2-2) B: Summary of FGF-2 purification with unclarified lysate and the tangential flow device; loading was performed in recirculation mode (see Fig. 2-2) C: Summary of FGF-2 purification with particle-free supernatant and the axial flow device, loading was performed in single pass mode..... 42

Figure 3-5: A: Summary of the static binding capacities. Comparison of the different initial loading modes with particle-free supernatant and unclarified cell lysate as a starting material. B: SDS-PAGE analysis of 3 different initial loading systems. Lane 1: Tangential flow device with unclarified cell lysate; Lane 2: Tangential flow device with particle-free supernatant; Lane 3: Axial flow device with particle-free supernatant. 44

Figure 3-6: Biological activity of FGF-2 purified with the tangential flow device and analyzed by NIH-3T3 cell viability..... 45

Figure 4-1: A: Effect of pH on the binding of BMP-2 dimer to the membrane materials. BMP-2 results [%] were based on the total amount of BMP-2 dimer applied to the membrane and were analyzed using gel densitometry after SDS-PAGE. The refolding solution was eluted with 2 M NaCl to ensure complete desorption. B: Selectivity of the membranes for the BMP-2 dimer at different pH values..... 61

Figure 4-2: SDS-PAGE of BMP-2 refolding solutions bound and eluted from three different membranes at pH 5. M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific); L1: Loading of refolding solution on Sartobind® S, W1: Washing, E1: Elution, L2: Loading of refolding solution on weak mixed mode CEX, W2: Washing, E2: Elution, L3: Loading of refolding solution on strong mixed mode CEX, W3: Washing, E3: Elution..... 62

Figure 4-3: Breakthrough curves of the mixed mode weak and strong CEX membrane adsorber devices. 1 mg/ml pure BMP-2 (dimer) was loaded on the membrane with a flow rate of 3 ml/min.....	63
Table 4-1: Comparison of 10% and 100% of dynamic binding capacities of the mixed mode CEX membrane adsorber devices	64
Table 4-2: Summary of BMP-2 purification with the weak mixed mode CEX membrane adsorber device.....	65
Figure 4-4: A: Chromatogram of the purification of rhBMP-2 using weak mixed mode CEX membrane chromatography. UV absorbance at 280 nm is shown. B: The resulting peak at ~ 120 ml was analyzed by Coomassie blue-stained non-reduced SDS-PAGE: M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific) L: loading of refolding sample, FT: flow-through, W: washing, E4-E7: peak fractions.....	66
Figure 4-5: Relative content of BMP-2 monomer and dimer in the process steps estimated by gel densitometry. The relative yield of the monomer was used for calculation until formation of the dimer during refolding; afterwards the BMP-2 dimer was taken into account. The BMP-2 amount in fermented cells (“cultivation”) was set to 100%.....	67
Figure 4-6: Purification of BMP-2 visualized with Coomassie brilliant blue stain on a non-reduced SDS-PAGE. 1: After cell lysis, 2: Washing step, 3: Solubilization, 4: Refolding t = starting point, 5: Refolding t = endpoint (after 5 d), 6: after weak mixed mode CEX membrane chromatography, M: Protein ladder #26610 (Thermo Scientific).....	67
Figure 5-1: Effect of different aiding compounds on the in-vitro dimerization of rhBMP-4. Additives were adjusted to the indicated concentrations. The standard composition of refolding buffer was used for all other parameters as described in the materials and methods section.....	79
Figure 5-2: Effect of pH on the refolding yield of rhBMP-4. Here, the pH was adjusted to the indicated values. The standard composition of refolding buffer was used for all other parameters.	80
Figure 5-3: Effect of different redox systems on the refolding yield of rhBMP-4. Here, glutathione concentrations were set to the indicated ratios. Standard composition of refolding buffer was used for all other parameters.	81

Figure 5-4: Effect of different concentrations of NaCl on the refolding yield of rhBMP-4. NaCl concentration was adjusted to the indicated values. Standard composition of refolding buffer was used for all other parameters. 82

Figure 5-5: Coomassie-stained, non-reduced SDS-PAGE showing the refolding process to rhBMP-4 dimer. 1: Sample of renaturation process at t_0 , 2: Sample of renaturation after 4 days incubation time (end point), 3: End point of refolding applied on a reducing gel, M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific) 83

Figure 5-6: a: Chromatogram of rhBMP-4 purification using cation-exchange membrane chromatography. Three steps were used for the elution of bound proteins (containing 150 mM NaCl, 300 mM NaCl and 500 mM NaCl). UV absorbance at 280 nm is shown. Flow rate was set to 1 ml/min. b: Coomassie-stained non-reduced SDS-PAGE: 1&2: elution fraction monomer, 3&4: elution fraction dimer, 5: aggregates, M: protein ladder #26610 (Thermo Scientific) 84

Figure 5-7: HiPSCs after 48 hours in differentiation medium with A: *E. coli*-produced rhBMP-4 (conc. 50 ng/ml), B: commercial rhBMP-4 (conc. 10 ng/ml) or C: without BMP-4 addition (negative control). Cdx-2 positive cells were stained green (upper row), cells with rhBMP-4 demonstrated typical cobblestone morphology on the second day of differentiation (middle row), cell nuclear counter staining with DAPI (last row), scale-bar 100 μ m. 85

Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustauschchromatographie
AS	Aminosäure
BMP	Bone morphogenetic protein
CEX	Kationenaustauschchromatographie
CSF	Kolonie-stimulierende Faktoren
Cys	Cystein
DC	Direct capture
DBC	Dynamische Bindungskapazität
EU	Endotoxin unit
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDF	Growth and Di_erentiation Vector
GPH	Glykoprotein-Hormonen
His	Histidin
HiPSCs	human induced pluripotent stemm cells
IB	Inclusion Body
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IL	Interleukine
INF	Interferone
LRV	Log reduction value
MA	Membranadsorber
OD	Optische Dichte
pI	Isoelektrischer Punkt
STIC	Salt tolerant Interaction Chromatography
TGF	Tranformation Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FF Pluronic	F127-Fibrinogen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Gesa Gieseler
Geburtsdatum 17.10.1988 , Wilhelmshaven
Nationalität Deutsch

Akademische und schulische Ausbildung

11/2013 – 08/2017 Promotionsstudium Chemie und wissenschaftliche Mitarbeiterin Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover Thema: Innovative Aufarbeitungsstrategien auf Membranadsorberbasis für Zytokine
10/2010 – 10/2013 Masterstudium Life Science (M.Sc.) Leibniz Universität Hannover
10/2008 – 09/2009 Bachelorstudium Life Science (B.Sc.) Leibniz Universität Hannover
08/2000 – 07/2008 Cäcilienchule (Abitur), Wilhelmshaven

Auslandserfahrungen

09/2012 – 09/2013 Auslandsstudium: Stanford University, Palo Alto, USA